

**UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT DER PROTEINSYNTHESE
IM THIAMIN ABHÄNGIGEN KEIM LACTOBACILLUS
VIRIDESCENS**

von
Martin Farnbacher
aus
Nürnberg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. W. Kersten

**UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT DER PROTEINSYNTHESE
IM THIAMIN ABHÄNGIGEN KEIM LACTOBACILLUS
VIRIDESCENS**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Martin Farnbacher

aus

Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der Universität

Erlangen - Nürnberg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut

der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. W. Kersten

UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT DER PROTEINSYNTHESE
IM THIAMIN ABHÄNGIGEN KEIM LACTOBACILLUS
VIRIDESCENS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. L. Demling

Referent: Professor Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 28.8.1973

Hilfsberg

Einleitung	1
I Material und Methoden	
A Material	4
B Methoden	5
1. Züchtung der Keime	5
2. Präparation von Ribosomen und S-100-Fraktion	8
3. S-100-Chromatographie	10
4. Durchführung von Ansätzen zum Peptidisiersystem	12
5. Ansätze zur Akzeptoraktivitätsprüfung der tRNA	17
II Vorversuche	19
1. Charakteristische Einbaudaten eines Ansatzes	20
2. Proteinsyntheseaktivität verschiedener Präparationen aus Keimen der Log-Phase	21
3. Aktivität der Zellextrakte nach längerer Lagerung	22
4. Defektlokalisierung durch Kreuzexperimente	24
5. Versuche zur Reaktivierung von Ribosomen	26
6. Kinetik des Phenylalanineinbaus	28
7. Einbau in Abhängigkeit von:	
a) Ribosomen	29
b) S-100-Protein	31
c) Poly U	32
d) Phenylalanin	33
e) Kalzium-Ionen	34
8. S-100-Chromatographien zur Abtrennung endogener tRNA	36
9. Akzeptoraktivität der tRNA	47
a) Spezifität der Aminoacylsynthetasen	48
b) S-100-Optimum zur Beladung	49
III Hauptversuche	51
Proteinsyntheseaktivität von Ribosomen und S-100 aus der Log-, Hunger- und Restaurationsphase	
1. Aktivität des homologen Systems	54
2. Aktivität der Ribosomen	56
3. Aktivität der S-100-Fraktion	58
4. Einbau mit Extrakten aus Restaurations- und Hunger-Phase	62
Diskussion	68
Zusammenfassung	76
Literatur	78

Die Arbeiten mit *Lactobacillus viridescens* haben das Ziel, zu erforschen, welche Wirkung der Entzug eines essentiellen Bestandteiles des Nährmediums, hier des Thiamins, auf den Mikroorganismus hat. Im einzelnen wurde anderwärts untersucht, wie sich der Gehalt an Makromolekülen der Zelle und ihre Mengenverhältnisse zueinander ändern, und welchen Einfluß der Thiaminmangel auf Zahl und biologische Aktivität von Zellorganellen (Ribosomen) hat (1, 2). Anhand der Proteinsynthese wurde untersucht, wie Leistungen des Zellstoffwechsels durch den Mangelzustand beeinflusst werden. Da die Zellen den 12-stündigen Mangel überleben, könnte man vermuten, daß nach Thiaminzugabe der ursprüngliche Zustand der Zelle durch Neusynthese und/oder Rekombination von in der Mangelperiode zerstörten Strukturen wiederhergestellt werden kann. Hieraus ergeben sich vielfältige Fragen nach der zeitlichen Aufeinanderfolge dieser Restitutionsvorgänge. Zur Bearbeitung derartiger Probleme eignet sich *L. viridescens* deshalb besonders, weil zwischen Zugabe des Vitamins nach dem Mangelzustand und Einsetzen von Zellteilungen 1 - 2 Stunden vergehen, in denen Veränderungen des Zellinhalts und von Stoffwechselleistungen untersucht werden können, ohne daß Material gleichzeitig unter Tochterzellen aufgeteilt wird.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einem Teilproblem, dem Vergleich der Proteinsyntheseaktivität in Zellen, die a) ausreichend Thiamin im Medium hatten, denen b) das Vitamin 12 Stunden entzogen worden war, und die c) nach Entzug wieder 40 Minuten lang Thiamin erhalten hatten.

Hierzu sind anderwärts (2) bisher folgende Befunde erhoben worden:

Es wurde die Proteinsyntheseaktivität von *Lactobacillus viridescens* in verschiedenen Wachstumsphasen in einem zellfreien Poly U/Poly Phe-System untersucht.

Hierzu setzte man zunächst Ribosomen und S-100-Überstand jeweils aus der gleichen Wachstumsphase der Keime ein.

Es ergab sich ein rapider Aktivitätsabfall (bis auf 1/10) je mehr die Keime die Log-Phase verließen und in die stationäre Phase eintraten. Ein weiterer geringfügiger Abfall trat ein, nachdem die Keime 12 Stunden in thiamin-freiem, aber sonst komplettem Medium verblieben waren.

Nach Zugabe von 100 μg Thiamin pro ml Nährmedium stieg die Proteinsyntheseaktivität zunächst langsam, dann immer schneller an, noch bevor erneute Zellteilungen eintraten. Nach 30 Minuten war die Aktivität bereits wieder um den Faktor 3,6 angestiegen, nach 3 1/2 Stunden war das System 13,5fach so aktiv wie nach 12 Stunden Thiaminentzug. Da zwei unterscheidbare Komponenten, nämlich Ribosomen und S-100-Überstand dem Präparationsvorgang entsprechend unmittelbar vorliegen, bot es sich an, zu untersuchen, ob der Aktivitätsverlust und die spätere Zunahme in beiden Komponenten abläuft, und wenn ja, ob dies in gleichem Ausmaß stattfindet. Hierzu musste jeweils eine Komponente aus der Phase maximaler Aktivität (Log-Phase) mit der anderen aus allen der Phasen durchgetestet werden. Bei (2) wurde der erste Teil des Problems gelöst:

Überstand der Log-Phase (Aktivität im Log/Log-System maximal) wurde mit Ribosomen aller Phasen inkubiert und mit dem jeweiligen homologen System (Ribosomen und S-100 der gleichen Phase) verglichen.

Ergebnis: Mit Log-Überstand waren die Ribosomen der Restaurationsphase beträchtlich zu stimulieren.

Man deutete den Befund dahingehend, daß im Thiaminmangel die Ribosomenaktivität abnahm und nach Thiaminzugabe rasch neue, aktive Ribosomen synthetisiert wurden. Durch Kontamination mit alten, inaktiven Ribosomen konnte auch Stunden nach Thiaminzugabe die Aktivität der Log-Phase (vor dem Hunger) nicht voll erreicht werden.

Die die Proteinsyntheseaktivität limitierenden Faktoren sollten im Überstand enthalten sein und man vermutete, daß sie kurze Zeit nach Thiamin-Zugabe noch nicht in genügender Konzentration vorhanden sind, sondern langsamer nachsynthetisiert wurden als die Ribosomen.

Wie groß die gezeigte Aktivitätsabnahme der Ribosomen im Thiamin-Hunger im Vergleich zu der vermuteten Abnahme der S-100-Aktivität sein würde, konnte nach den Ergebnissen von (2) nicht gesagt werden.

Der zweite Teil der Untersuchungen zur Lokalisation der Ursache des Aktivitätsverlustes unter Mangelbedingungen, nämlich die Prüfung der Aktivität des S-100-Überstandes verschiedener Phasen, soll hier zusätzlich gebracht werden. Dann wird eine Gesamtaussage über die Aktivität des Proteinsynthetisierenden Systems im Thiaminmangel möglich sein.

I. Material und Methoden

A Material

Der für sämtliche Versuche verwendete Mikroorganismus war *Lactobacillus viridescens* S 38 A ATCC 12706 der Torry Research Station, Aberdeen, Schottland.

Die Züchtung der Keime erfolgte in den Nährmedien Bacto APT Broth 0655-01 und Bacto Thiamine Assay Medium LV 0808-15 der Difco Laboratories.

Als markierte Aminosäure wurde ausschließlich ^{14}C Phenylalanin des Radiochemical Centre Amersham eingesetzt. Die ursprüngliche spezifische Aktivität von 477 mCi/mM erniedrigten wir in der Regel auf 47,7 mCi/mM, indem wir ^{12}C Phe zugaben.

Poly Uridylsäure wurde von Miles Chemical Comp. bezogen. Wir verwendeten folgende tRNAs:

1. Gesamt-tRNA aus *E. coli* und Phenylalanin-spezifische tRNA aus Hefe der Firma Boehringer, Mannheim.
2. tRNA-Eigenpräparationen aus *L. viridescens*-Keimen und S-100-Überstand desselben Keimes.

ATP, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat-Kinase stammten von Boehringer, Mannheim, GTP von Calbiochem, Desoxyribonuclease I von Worthington, β -Mercaptoäthanol von Sigma, DEAE-Zellulose von Whatman, Aluminiumoxid (Alcoa) von der Aluminium Corporation of America, Selekt Filterpapierscheiben Nr. 598 ($\varnothing$ 2,3 cm) und Faltenfilter von der Firma Schleicher und Schüll, PPO und POPOP von der Firma Packard Instruments, Frankfurt (gelöst in technischem Toluol).

B Methoden

Züchtung der Keime

Die Züchtung der Keime erfolgt in Bacto-APT-Broth (Log-Phase-Keime), bzw. Bacto Thiamine Assay Medium LV (Hunger- und Restaurationsphase), (4, 5) gemäß Vorschrift der Firma Difco. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich bei (3). Die Nährmedien wurden im Bakterienfilter Seitz kalt sterilisiert.

a) Log-Phase-Keime:

Von Schrägagarkulturen ausgehend wurde, durch Weitervermehrung über steigende Volumina, das Kulturvolumen (10 oder 20 Liter) angeimpft, und das Wachstum durch Bestimmung der Extinktion bei 578 nm in steril entnommenen Proben verfolgt (Streulichtaufsatz, Photometer Eppendorf). Die Abhängigkeit der Farbintensität des Mediums von der Vorbehandlung macht es erforderlich, gegen unbeimpftes Medium zu messen. Sämtliche Schritte wurden mit einem Kulturausstrich zur Reinheitskontrolle verbunden, da die Gefahr des Überwucherns durch andere Keime im Vollmedium besonders groß ist. Wegen der durch inkonstantes Überimpfungsverhältnis schlechten Reproduzierbarkeit des Wachstums in großen Volumina, hat die Extinktionskontrolle nach ca drei Stunden mindestens halbstündlich zu erfolgen. Bei Erreichen von 0,6 - 0,7 OD₅₇₈ wurde das Wachstum durch rasches Herunterkühlen in Eis/NaCl-Mischung beendet und abzentrifugiert. Die Ernte zu diesem frühen Zeitpunkt

stellt einen Kompromiß dar zwischen Ausbeute einerseits und Proteinsyntheseaktivität andererseits.

Das Bakterienpellet wurde in 0,9 % Kochsalzlösung aufgenommen, gewaschen, und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung dieser Behandlung sollte das Pellet weiß aussehen, der Überstand frei von Mediumspuren sein. Bis zur Verarbeitung wurden die Keime bei -20°C aufbewahrt.

b) Die Züchtung von Keimen der Restaurations- und Hungerphase geschah folgendermaßen:

In kleinen APT-Volumina gewachsene Keime wurden bei 4°C steril abzentrifugiert und zur Entfernung von Thiamin und Nährmedium folgender Waschprozedur unterworfen:

Aufnahme des Pellets in steriler 0,9 % Kochsalzlösung, Zentrifugation, erneute Aufnahme und Zentrifugation und nochmalige Wiederholung.

Sämtliche Schritte erfolgen bei 4°C .

Nach Ausstrich eines Tropfens zur Reinheitskontrolle können die Keime in vier Liter TAM, dem Thiamin zu einer Konzentration von $5\text{ }\mu\text{g/l}$ zugesetzt ist, überimpft werden.

Diese Thiaminkonzentration ermöglicht ein eingeschränktes Wachstum bis ca. $1,1\text{ OD}_{578}$. Etwa vier Stunden nach Erreichen dieser stationären Phase (ca. 16 h), wurde steril abzentrifugiert, die Sedimente der 4-Liter-Kultur in NaCl-Lösung aufgenommen und vereinigt. Die oben beschriebene Waschprozedur schließt sich an.

Es folgt 12-stündiger "Thiamin-Hunger" in 8 Litern TAM ohne Thiaminzusatz. Die Extinktionszunahme darf während dieser Zeit etwa $0,04\text{ OD}_{578}$ nicht überschreiten. Fremdkeimbefall, während eines der vorangegangenen Schritte zeigt sich in starker Extinktionszunahme, da für viele Keime im

Medium beste Wachstumsbedingungen vorliegen.

Nach 12 Stunden Hunger erfolgt entweder Ernte, wie beschrieben ("Hunger-Keime"), bzw. Zugabe von 100 µg/ml Thiamin.

40 Minuten später wird abzentrifugiert und wie beschrieben weiterbehandelt ("Restaurations-Keime").

Als Bestätigung für das Vorliegen eines thiaminauxotrophen Keims wurde das Wachstum bei verschiedenen Thiaminkonzentrationen im Medium verfolgt. Wie Abb. 1 zeigt, ist das Wachstum durch den Thiamingehalt limitiert. Zugabe eines Überschusses von Thiamin zum Mangelmedium bewirkt einen neuen Wachstumsanstieg.

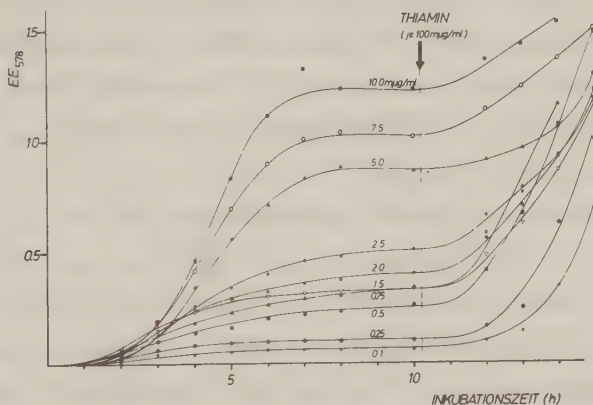


Abb. 1
Graphische Darstellung des Wachstums von *L. viridescens* bei verschiedenen Thiaminkonzentrationen (µg/ml) im Nährmedium (TAM).
Vorgegangen wurde nach den Anweisungen von Difco (5).
Die Inkubationstemperatur betrug jedoch 37° C.
Etwa 1 - 2 Stunden nach Erreichen der Ruhephase (10 1/4 Stunden nach Inoculation) wurden 100 µg/ml Thiamin zu allen Kulturen direkt zugegeben.
Trübungsmessung mit Streulichtaufsatz auf dem Photometer Eppendorf bei 578 nm.

Präparation von Ribosomen und S-100-Fraktion

Die Präparation erfolgte durch manuellen Aufschluß der Keime im Mörser und anschließende Zentrifugation (7, 8). Aufschlußmittel war Alcoa (doppelte Gewichtsmenge wie Bakterienfeuchtgewicht), das im Mörser über Nacht bei -18°C vorgekühlt wurde.

Zur Frage der Aufschlußdauer glauben wir mit "doppelt so viele Minuten wie Bakterienmasse in Gramm", für den uns interessierenden Bereich von ca. 3 - 6g, einen tragbaren Kompromiß zwischen Ausbeute einerseits, und guter Aktivität im Proteinsynthesesystem andererseits geschlossen zu haben. Der Aufschluß von mehr als 6 - 7g Bakterien pro Mörser auf einmal, sowie lange Aufschlußzeiten (bis 30 Minuten) haben sich nicht bewährt. Unergiebig waren auch die Versuche, den Mörser bei -50°C vorzukühlen oder das **a u f g e t a u t e** Bakterienpellet nur kurzzeitig (2 Minuten) aufzuschließen.

Das Aufschlußgut wurde in Standard-Puffer (2) mit 4 μg DNAase I pro ml aufgenommen, wobei höchstens das "2fache Volumen" verbraucht werden sollte (d. h. doppelt so viele ml wie Bakterienmasse in Gramm). Die hier geschaffene Verdünnung ist für den späteren Proteingehalt der S-100-Fraktion maßgebend. Das Sediment der ersten niedertourigen Zentrifugation (10 min 10 000 x g) wurde zur Verbesserung der Ausbeute erneut in Präparationspuffer aufgenommen und zentrifugiert.

Der Gesamtüberstand wurde 30 min mit 30 000 x g zentrifugiert. Aus dem nun resultierenden Überstand (S-30) wurden

die Ribosomen in der präparativen Ultrazentrifuge MSE 65 absedimentiert (2 Stunden 130 000 x g). Die oberen 2/3 des Überstandes dieser Zentrifugation (S-100) wurden vier Stunden gegen je einen Liter Standard-Puffer, bei stündlichem Pufferwechsel, dialysiert und anschließend in 0,5 ml-Portionen in flüssiger Luft eingefroren und darin aufbewahrt.

Das untere Überstandsdrittel wird üblicherweise nicht zur Proteinsynthese verwendet (Hemmfaktoren?). Bei einem Versuch, diese Fraktionen im Poly U/Poly Phe-System einzusetzen, fanden wir keine verminderte Aktivität.

Die Ribosomen wurden in Puffer mit 0,5 M NH_4Cl aufgenommen, im Dounce-Homogenisator homogenisiert und die Suspension eine Stunde bei 260 000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte Aufnahme in Puffer (ohne NH_4Cl). Das Volumen betrug etwa "halb so viele ml wie eingesetzte Keime in Gramm". Der Überstand der anschließenden niedertourigen Zentrifugation (10 min 10 000 x g), die Ribosomen-Stamm-lösung, wurde portioniert und in flüssiger Luft eingefroren.

Die Bestimmung der Ausbeute an Ribosomen erfolgt durch Messung der OD_{260} im Zeiss-Photometer PMQ II. Die Proteingehalte der Ribosomen wurden mit der Methode nach Lowry et al. (9), die der RNA nach der Orcin-Methode bestimmt (10).

Durch weitere Reinigungsschritte lassen sich bei E. coli erheblich aktivere Ribosomen präparieren, etwa durch fraktionierte NH_4Cl -Waschungen (11) oder durch Sedimentation durch 0,5 M Saccharose. Hierbei werden, bei optimaler Bemessung der Zentrifugationszeit reine 70 S-Ribosomen

gewonnen. Alle diese weitergehenden Reinigungen sind mit zusätzlichen Arbeitsschritten verbunden und vergrößern die Zeitspanne zwischen Aufschluß und Einfrieren der Extrakte. Angesichts der Schwierigkeiten bei der Präparation aktiver Komponenten unterblieben sie zugunsten des skizzierten kürzeren Weges.

Nach (2) erbrachte eine dreifache NH_4Cl -Waschung (11) bei *L. viridescens* keine Steigerung der Ribosomenaktivität.

Den Berechnungen des Einbaus wurden die über die Extinktion bei 260 nm ermittelten Ribosomengehalte zugrunde gelegt. Wir haben mit der Beziehung: 16 OD_{260} entspricht $0,35 \text{ nM}$ Ribosomen, gearbeitet (12).

In vielen Fällen berechneten wir die RNA-Protein-Verhältnisse der Ribosomen. Die bei Julien et al. (2) angegebenen Werte ließen sich bei uns nicht als derart konstant bestätigen. Das Verhältnis RNA : Protein schwankte von mindestens 40 : 60 bis 60 : 40 für Ribosomen aus Keimen der Log-Phase.

Der Versuchsablauf bei S-100-Chromatographien (13) war folgender:

Eine gekühlte 1 x 10 cm-Säule mit DEAE-Zellulose wurde über Nacht mit Standard-Puffer (0,1 M Tris-HCl) äquilibriert. Maximal 10 ml frisch präparierte S-100-Fraktion wurden aufgetragen und mit obigem Puffer eluiert. Die Absorption des Eluats bei 254 nm wurde im Uvicord verfolgt und aufgezeichnet.

Nach Elution eines ersten Gipfels (ca. 7 Stunden) wechselten wir den Puffer und erhöhten die Ionenstärke auf 1,0 M Tris-HCl. Damit ließ sich in weiteren drei Stunden ein nächster Gipfel eluieren.

Die zu den entsprechenden Gipfeln gehörenden Fraktionen wurden vereinigt und ohne Einengung, teils eingefroren, teils unmittelbar nach Elution ins Poly U/Poly Phe-System eingesetzt.

Ansätze zur Bestimmung des Einbaus von Phenylalanin
mit zellfreien Extrakten aus *L. viridescens* und Poly U
als künstlichem Messenger

Gesamtvolumen des Ansatzes: 250 μ l.

Die Konzentrationen betragen: Tris-HCl: 45 mM; Mg-azetat: 20 mM; KCl: 87 mM; β -Mercaptoäthanol: 10 mM.

Die obigen Konzentrationen errechnen sich aus der Summe der über 100 μ l Energiepuffer und 100 μ l Ribosomen/S-100-Mischung eingebrachten Einzelkonzentrationen.

ATP: 1 mM; GTP: 0,3 mM; PEP: 5 mM; Pyruvat-Kinase, entsalzt: 7,5 μ g (tRNA aus *E. Coli* u. a., z. B. 125 μ g); Poly U in aqua bidest.: 20 oder 40 μ g; Ribosomen: 10 - 20 OD₂₆₀; S-100-Protein: 400 - 600 μ g; ¹⁴C Phe (48 mCi/mM, 380 000 cpm): 5 nM, 0,25 μ Ci.

Die Herstellung von Präparations- und Energiepuffer erfolgte mit Hilfe hochkonzentrierter Stammlösungen von Tris-HCl, Mg-azetat, KCl und β -Mercaptoäthanol.

Vor Herstellung des energieliefernden Systems wird die Pyruvat-Kinase, die als Kristallsuspension in 3,2 M (NH₄)₂SO₄ geliefert wird, folgendermaßen entsalzt:

Eine 1,5 x 16 cm Säule mit Sephadex G 25 wird mit Puffer von 0,5 M Tris, 0,03 M Mg-azetat, 0,13 M KCl, 0,016 M β -Mercaptoäthanol bei 4° C äquilibriert und mit demselben Puffer die aufgetragene Pyruvat-Kinase eluiert. Hierbei wird die Extinktion bei 280 nm gemessen und die Fraktionen des ersten Gipfels zusammengegeben.

Der Enzymgehalt läßt sich mit der Beziehung 1 mg Pyruvat-Kinase entspricht 0,54 OD₂₈₀ berechnen (14).

Das Auftreten der Sulfat-Ionen wurde mit der Bariumchlorid-Probe bestimmt.

Bei der Herstellung des energieliefernden Systems ist die entsalzte Pyruvat-Kinase als letzte der Lösungen unter Rühren zuzugeben, da sonst Ausfall (Aussalzung) des Enzyms in der hochkonzentrierten Salzlösung erfolgt.

Der Energiepuffer wird portioniert, in flüssiger Luft eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Ein Abfall der Aktivität innerhalb von 10 Monaten war nicht zu beobachten. Für sämtliche Versuche wurde Energiepuffer derselben Präparation verwendet.

Der Phenylalanineinbau in säurefällbares Polypeptid wurde mit der Filterplättchenmethode (15) durch eine Zählung der cpm des eingebauten ^{14}C Phe im Szintillationszähler gemessen. Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor: Die benötigten Substanzen wurden während des Versuchs in einer Eiswanne aufbewahrt, Ribosomen und insbesondere S-100 frisch aus der flüssigen Luft geholt und langsam aufgetaut.

Die Filterscheibchen wurden beschriftet und griffbereit aufgereiht, die Ansatzgläschen und die zur Fällung der Makromoleküle verwendete Trichloressigsäure (10 % mit 0,1 M Phe; 3 ml/Filter) in Eis gestellt.

Das Pipettieren der Volumina erfolgte mit Konstriktionspipetten und Mundschlauch in der Reihenfolge Phe, (tRNA), H_2O , Energiepuffer, Ribosomen/S-100-Mischung, Poly U. Die Substanzen wurden an der Glaswand "über-

einander" pipettiert, so daß jede die vorangehende hinabspülte.

Die aufgetragenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Als Leerwerte wurden pipettiert: Je ein Ansatz ohne Poly U und einer ohne Ribosomen/S-100.

In einen "Normalansatz" - etwa zur Testung einer Neu-präparation - wurden in der Reihenfolge des Vorgehens eingesetzt:

1. 10 μ l Phe (^{12}C und ^{14}C), entsprechend 5 nM und 380 000 cpm.
- (2. 10 - 20 μ l tRNA in aqua bidest. gelöst; etwa 3 - 6 OD_{260} .)
3. x μ l aqua bidest. (x so gewählt, daß das Endvol. 250 μ l beträgt).
4. 100 μ l Energiepuffer.
5. 100 μ l einer Mischung von Ribosomen und S-100; Verhältnis oft 1 : 1.
6. 10 μ l einer wässrigen Lösung von Polyuridylsäure; 20 bzw. 40 μg .

Nach Zugabe von Ribosomen/S-100 und Durchmischung mit dem Whirlmix, kamen die Gläschen zur Präinkubation in Minutenabständen für 10 Minuten ins Wasserbad (37°C). Dabei sollte vorhandener endogener Messenger, vor Zugabe des künstlichen (Poly U), zerstört werden. Danach wurde Poly U zugegeben, durchmischt und erneut inkubiert, in derselben Reihenfolge wie oben, wiederum in

Minutenabständen. Aus dem Ansatz wurden zwei mal 100 µl zu verschiedenen Zeitpunkten (z. B. 20 und 40 Minuten nach Inkubation) entnommen, auf ein Filterscheibchen pipettiert, dieses ca. 20 sek. geföhnt und in kalte Trichloressigsäure (10 %) gegeben, zur Fällung der Makromoleküle in der Zellulosematrix.

Zu den beladenen Filterscheibchen wurde noch ein "leeres" mit in die Säure gegeben (Blindwert), um das Ausmaß des unspezifischen Austausches von Radioaktivität zwischen den Scheibchen untereinander zu erfassen. Die Filter können über Nacht in der Säure verbleiben, oder nach drei Stunden weiter bearbeitet ("gewaschen") werden, da die Fällung fast schlagartig erfolgt und kein Abbau des synthetisierten Polypeptids innerhalb von 24 Stunden in der Kälte erfolgt.

Man holt die Filter einzeln aus der Trichloressigsäure und verteilt sie auf dem in einem Trichter ausgebreiteten Faltenfilter. Dieser Schritt des Absaugens der Flüssigkeit durch die Kapillarkräfte des Fließpapiers ist, wie sich zeigen läßt, entscheidend für die Entfernung von nicht eingebautem ^{14}C Phe. Die Absaugung der niedermolekularen oder nicht eingebauten Radioaktivität gelingt hierdurch sehr gut.

Die Filter werden anschließend in 5 % Trichloressigsäure gegeben; Verweilzeit z. B. 15 Minuten, da, wie gesagt, das Absaugen der Waschflüssigkeit, nicht das Verweilen darin für die Effektivität der Waschung entscheidend ist.

Es schließt sich die Hydrolyse der Nucleinsäuren in 5 % TCA bei 90° C an. Sie ist nötig, damit nicht Radioaktivität der mitgefällten beladenen tRNA in die Berechnung des synthetisierten Polypeptids einbezogen wird.

Es folgt ein weiterer Waschschrift in 5 % Trichlor-essigsäure in der Kälte, letztmaliges Abtropfen auf dem Faltenfilter und Entzug von Wasser und Lipiden in Äther/Äthanol 1 : 1 bei 37° C. Anschließend werden die Filter in Packard-Gläschen überführt und, nach Trocknung im Trockenschrank und Zugabe von Toluol-Szintillator (ca. 8 ml/Glas) im Packard-Flüssigkeitsszintillationszähler, mit 70 % Zählausbeute für ^{14}C , gezählt. (Szintillator: 5 g PPO und 0,3 g POPOP pro ltr.).

Meist berechneten wir die auf ein Picomol Ribosomen bezogenen, eingebauten Nanomol Phenylalanin.

Mit folgenden Angaben ist die Umrechnung möglich:

Bekannt sind

1. cpm des Ansatzes und die des Blindwertes
2. Eingesetzte OD_{260} Ribosomen pro Ansatz und damit pro 100 μl (Volumen einer Entnahme)
3. Die Beziehung 16 OD_{260} entsprechen 0,35 nM Ribosomen (11)
4. 1 000 cpm entsprechen, bei Verwendung von Phe der spezifischen Aktivität von 47,7 mCi/mM, einem Phe-Einbau von 0,013 nM.

Die Fähigkeit unserer tRNA-Präparationen, Aminosäuren zu akzeptieren, testeten wir in folgendem System, einer Modifikation von (16), das zur Testung tierischer tRNA bestimmt ist.

Zu einem kompletten Ansatz wurden zusammenpipettiert:

1. 10 μ l Phenylalanin der spezifischen Aktivität 477 mCi/mM.
 2. 30 - 50 μ l tRNA (etwa 300 μ g)
 3. 10 μ l "Aminosäure-Mix", einer Mischung von 19 unmarkierten Aminosäuren (Konzentration je 50 nM/ml)
 4. 20 μ l Rinderserumalbumin als Träger bei der Fällung (500 μ g/20 μ l)
 5. 100 μ l Energiepuffer
 6. Aqua bidest. ad 250 μ l Ansatzendvolumen
 7. 10 μ l mit S-100, 1 : 12 verdünnt mit Standard-Puffer.
- In einer Verdünnungsreihe wurde damit die höchste Beladung ermittelt.

Die Konzentrationen im Ansatz waren:

Tris-HCl: 41,4 mM; Mg-azetat: 13,52 mM; KCl: 65,4 mM;
 β -Mercaptoäthanol: 7,84 mM.

Die Veränderung gegenüber dem Peptidisieransatz rühren daher, daß nur 10 μ l S-100-Verdünnung eingesetzt wurden (gegenüber 100 μ l Ribosomen/S-100-Mischung).

Ferner: ATP: 1,0 mM; GTP: 0,3 mM; PEP: 5,0 mM; Pyruvat-Kinase: 7,5 μ g; tRNA: z. B. 7 OD₂₆₀, ¹⁴C Phe (spez. Akt. 477 mCi/mM, 380 000 cpm): 0,5 nM; Aminosäure-Gemisch: 19 x 0,5 nM; Rinderserum-Albumin: 500 μ g; S-100-Protein: ca. 40 μ g.

Zusätzlich zu dem Komplettansatz wurden je einer ohne Enzym und einer ohne tRNA als Leerwert mitgeführt. Nach bis zu 40 Minuten Inkubation bei 30° C entnahmen wir Proben von je 100 µl, pipettierten auf Filterscheibchen, wobei wir Glasfaser- und Zellulosescheibchenfilter testeten.

Die Weiterbehandlung geschah wie beim Peptidisiersystem beschrieben, unter Auslassung des Hydrolyse-Schrittes. Bei diesem Vorgehen waren die Leerwerte unverhältnismäßig hoch, z. B. 40 % des Kontrollansatzes.

Zur besseren Ablösung unspezifisch adsorbierter Radioaktivität, und damit Senkung der Leerwerte, führten wir eine intensivere Waschung durch: Jedes Filterscheibchen wurde in 10 % TCA gegeben, 5 Minuten später entnommen und auf einen Büchnertrichter (Volumen 50 ml) mit Filterpapier gelegt, mit 50 ml 5 % TCA/Filter durchgesaugt und in 5 % TCA gegeben. Die restlichen Schritte, mit Ausnahme der Nucleinsäurehydrolyse, erfolgten analog denen beim Peptidisieransatz.

Die Berechnung der tRNA-Beladung geschah wie folgt:

1. Die Radioaktivität des Leerwertes wird von der des Meßwertes subtrahiert.
2. Bezogen wird auf 1 OD₂₆₀ tRNA.
3. Der Berechnung des pro OD₂₆₀ gebundenen Phe liegt die Beziehung zugrunde: 1 000 cpm $\hat{=}$ 0,0013 nM Phe.

Vorversuche

Um Aussagen über die Aktivität des proteinsynthetisierenden Systems in den unter verschiedenen Ernährungsbedingungen gewachsenen Keimen verschiedener Wachstumsphasen machen zu können, ist es nötig, ein optimal funktionierendes Test-System zur Verfügung zu haben, ein System, das Einbau in Abhängigkeit von der Konzentration der Komponenten Ribosomen, S-100, Poly U und tRNA zeigt und energieabhängig arbeitet.

Zu fordern ist, daß wiederholte Präparationen, auch aus Keimen verschiedener Züchtungen derselben Wachstumsphase vergleichbare Ergebnisse liefern.

Einbauunterschiede, bei Variation entsprechend der Fragestellung, sind dann mit Sicherheit nicht zufällig, sondern Ausdruck einer veränderten Aktivität, was immer ihr zugrunde liegt. Zur Optimierung eines Systems wird man die Abhängigkeit des Einbaus von der Konzentration jeweils einer Komponente, unter Konstanthaltung aller übrigen, untersuchen.

Im Idealfall sollten schließlich die Daten für ein System vorliegen, in dem die Konzentration der Komponenten, pH, Temperatur, Ionenmilieu, Inkubationszeit etc. optimal gewählt sind.

Unsere Untersuchungen zur Optimierung des Poly U/Poly Phe-Systems bei *L. viridescens* sind im folgenden wiedergegeben.

Die Leistungsfähigkeit des Systems mit zellfreien Extrak-
ten aus *L. viridescens* sei anhand der Daten einer "gut akti-
ven" Präparation in der folgenden Tabelle charakterisiert:

Tabelle 1: Phenylalanin-Einbau im kompletten System und
bei Fehlen verschiedener Komponenten

	Inkub. Zeit	cpm	Phe-Einbau (pM Phe/nM Rib.)	% bzgl. Komplett
Kompletter Ansatz	20'	1306	196	100
	40'	3061	459	
Ohne Ribosomen	20'	141	21	10,8
	40'	392	59	12,8
Ohne S-100	20'	144	22	11,0
	40'	300	45	9,8
Ohne Rib./S-100	20'	20	3	1,5
	40'	15	2	0,5
Ohne Poly U	20'	177	27	13,8
	40'	256	38	8,4

Pro 100 μ l wurden eingesetzt: 5,3 OD₂₆₀ Ribosomen, 250 μ g S-100-Protein, 8 μ g Poly U. Es wurde keine tRNA zugegeben. Ribosomen und S-100 stammen aus einer Präparation; alle Ansätze wurden am gleichen Tag durchgeführt. Vorgehen wie unter Methoden beschrieben.

Es war schwierig, gleich aktive Präparationen herzustellen. In Tabelle 2 sind die Aktivitäten der meisten unserer Präparationen aus Keimen der Log-Phase dargestellt. Aufgeführt sind der Einbau nach 20 und 40 Minuten Inkubation für das komplette System, sowie der Prozentsatz des Einbaus im Ansatz ohne Messenger, bzw. ohne Ribosomen und S-100-Überstand (Leerwert).

Tabelle 2: Aktivität des Poly U/Poly Phe-Systems in verschiedenen Präparationen aus Zellen der Log-Phase.

Ansatz Nr.	Präp. Nr.	Phe-Einbau in (pM Phe/nMRibosom)	% Einbau ohne Messenger	% Einbau ohne Rib./ S-100
3	II	40 49	2,4	0,6
13	III	7 15	21,8	12,8
15	IV	55 56	15,0 19,0	9,1 6,2
16	V	11 18	27,0 31,0	9,6 6,9
21	VI	14 22	17,1 6,5	6,3 4,4
22	VII	40 72	3,3 3,3	6,6 1,2
27	VIII	6 6	6,8 23,4	1,5 7,8
38	X	14 9	29,0 93,0	---
39	XI	22 19	31,3 28,0	---
46	XIV	21 77	12,1 3,3	0,3 0,3
67	XVIII	196 459	13,6 8,4	4,6 1,0
74	XX	614 971	4,1 2,9	---

Alle Ansätze wurden wie unter Methoden beschrieben durchgeführt. tRNA wurde in keinem Fall zugegeben. Aufgeführt sind die Daten für 20 und 40 Minuten Inkubation.

Folgendes erscheint uns hierbei bemerkenswert:

1. Die Phenylalanineinbauten schwanken sehr stark; die Ursache für fast inaktive Präparationen war in einigen Fällen möglicherweise zu langer Aufschluß oder Verwendung von Keimen aus der späten Log-Phase. In der Mehrzahl der Fälle können wir keinen Grund für die geringe Aktivität angeben.
2. Je höher der Phe-Einbau, desto mehr fallen die Werte für den Ansatz ohne Messenger bzw. ohne Ribosomen/S-100 prozentual zurück, nämlich unter 5 %, bzw. unter 1 %.

Für die systematischen Untersuchungen wurde ausschließlich Material der Präparationen II, IV, VII, XIV, XVIII, und XX verwendet.

Lagerungsversuche

Selbst mit Material der gleichen Präparation sind an verschiedenen Tagen quantitativ stark differierende Ergebnisse erzielbar. Wir machten mehrfach die Beobachtung, daß eine a k t i v e Präparation, in flüssiger Luft aufbewahrt, sehr wohl über Wochen ohne Aktivitätsverlust gelagert werden kann.

Tabelle 3: Aktivität des Poly U/Poly Phe-Systems mit
zellfreien Extrakten aus einer Präparation,
getestet an verschiedenen Tagen (Lagerbarkeit).

Präp. Nr.	Präp. Datum	getestet am	cpm	Bemerkung
XII	26.4.	26.4.	91 120	Aussage nur für Ribosomen möglich, da S-100 aus Präp. XV verwendet
		30.6.	1405 3635	
		2. 7.	1735 3635	
XX	8.9.	10.9.	1234 3014	Ribosomen und S-100 jeweils aus dersel- ben Präparation
		22.9.	3061 6053	
		28.9.	4585 7687	
VII	9.3.	9.3.	697 1260	
		17.3.	1809 2572	

Pro 100 µl wurden eingesetzt:

Präparation	XII	XX	VII
Ribosomen	15	8	26 OD ²⁶⁰
S-100-Protein	275	409	550 µg

Poly U: 8 µg. Die cpm beziehen sich auf 20 und 40 Minuten
Inkubation. Ribosomen und S-100 wurden während des ent-
sprechenden Zeitraumes in flüssiger Luft aufbewahrt. Durch-
führung der Ansätze wie unter Methoden beschrieben.

Es wird ersichtlich, daß in einem Zeitraum von zumindest drei Monaten an aktiven Ribosomen mit Sicherheit kein Aktivitätsverlust nachweisbar ist (Präp. XII), während bei (2) ein Aktivitätsverlust von 20 % innerhalb von 8 Tagen mitgeteilt wird. Für die S-100-Fraktion beträgt der hier untersuchte Zeitraum nur drei Wochen; es gilt dieselbe Feststellung. Weshalb die Aktivität jedoch nicht nur nicht abnimmt, sondern merklich ansteigt, ist unklar.

Lokalisation des Defektes

In einigen Fällen versuchten wir durch Kreuzexperimente herauszufinden, ob bei inaktiven Präparationen die beiden Komponenten Ribosomen und S-100 vermindert aktiv waren, oder nur eine der beiden betroffen war. Hierzu setzten wir Ribosomen oder S-100 einer aktiven Präparation aus *L. viridescens* oder *E. coli* mit S-100 bzw. Ribosomen der zu testenden Präparation ins Poly U/ Poly Phe-System ein.

Tabelle 4: Defektlokalisierung der Präparation XV durch Kreuzexperimente im heterologen System mit *E. coli*

Ü B E R S T A N D	R I B O S O M E N	
	<i>L. viridescens</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. viridescens</i>	183 273	436 572
<i>E. coli</i>	174 204	1217 1578

Pro 100 μ l Ansatz wurden eingesetzt: 4,6 OD₂₆₀ Ribosomen aus *L. viridescens*; 160 μ g S-100-Protein aus *L. viridescens*; 25 OD₂₆₀ Ribosomen und 800 μ g S-100-Protein aus *E. coli*; 8 μ g Poly U.
Die Zahlenwerte sind cpm für 20 und 40 Minuten Inkubation.

Tabelle 4 zeigt, daß, ausgehend vom homologen System aus *L. viridescens*, durch Verwendung von Ribosomen aus *E. coli* eine Stimulation auftritt. *E. coli*-Überstand vermag *L. viridescens*-Ribosomen jedoch nicht zu stimulieren, d. h. der Defekt liegt in diesem Fall bei den Ribosomen. Diese Aussage kann getroffen werden, obwohl von *E. coli* Ribosomen und Überstand jeweils die fünffache Menge eingesetzt wurde.

Die bei der ersten Testung nach der Präparation als inaktiv befundene Präparation III wurde mit S-100-Überstand aus Präparation II getestet; hierbei ergab sich folgendes:

Tabelle 5: Defektlokalisierung bei Präparation III durch Kreuzung mit Extrakten aus Präparation II

		Präp. III homolog	Ribos. III S-100 II	Präp. II homolog
cpm nach	20'	145	897	1037
	40'	138	955	1184

Pro 100 μ l Ansatz wurden eingesetzt:
Präparation II: 5,4 OD₂₆₀ Ribosomen, 250 μ g S-100-Protein
Präparation III: 6,4 OD₂₆₀ Ribosomen, 280 μ g S-100-Protein
8 μ g Poly U. Vorgegangen wurde wie unter Methoden beschrieben.

Der Defekt lag hier überwiegend oder ausschließlich beim S-100-Überstand.

Versuche zur Reaktivierung von Ribosomen

Für *E. coli* sind in der Literatur Methoden beschrieben, um durch Inkubation bei höheren Temperaturen, Fällung mit Äthanol, oder durch Behandlung mit NH_4Cl Ribosomen geringer Aktivität (aus der stationären Phase) zu aktivieren (17).

Unter der willkürlichen Annahme, daß die Ursache für die geringe Aktivität unserer Ribosomen dieselben waren, wie bei Ribosomen der stationären Phase, versuchten wir mit diesen Methoden wenig aktive Ribosomen aus *L. viridescens* (aus der Log-Phase) zu aktivieren.

1. Wir brachten 0,5 ml Ribosomenstammlösung einer schwach aktiven Präparation mit 2 M NH_4Cl auf eine Konzentration von 0,56 M, inkubierten 10 Minuten bei 50°C und prüften die Aktivität der Ribosomen im Poly U/Poly Phe-System.

Tabelle 6: Versuch der Ribosomenaktivierung in 0,56 M NH_4Cl bei 50°C .

	ohne NH_4Cl -Aktivierung	mit NH_4Cl -Aktivierung
cpm des kompletten Ansatzes	225 198	87 107
Ansatz ohne Poly U	91 77	91 108

Pro 100 μl Ansatz wurden verwendet:
 4,6 OD_{260} Ribosomen, 160 μg S-100-Protein, 8 μg Poly U.
 Die Zahlenwerte sind cpm für 20 und 40 Minuten Inkubation.
 Vorgehen, wie unter Methoden beschrieben.

Tabelle 6 zeigt, daß die für Ribosomen aus *E. coli* beschriebene Aktivierung mit NH_4Cl bei Ribosomen aus *L. viridescens* nicht nachzuweisen ist.

2. Wir versetzten je 0,5 ml Ribosomenstammlösung zweier Präparationen mit Äthanol (-50°C) und ließen eine Stunde bei dieser Temperatur stehen. Dann wurde 10 Minuten bei $10\,000 \times g$ abzentrifugiert und das Pellet wieder in Standard-Puffer gelöst.

Tabelle 7: Ribosomenaktivierung durch Fällung mit Äthanol in der Kälte

		Präparation XV		Präparation XII	
		mit	ohne	mit	ohne
		Äthanol-fällung		Äthanol-fällung	
cpm nach	20'	531	647	341	1405
	40'	1388	1191	764	3024

Pro 100 μl Ansatz wurden eingesetzt:
 4,6 OD₂₆₀ Ribosomen aus Präp. XV; 6,0 OD₂₆₀ aus Präp. XII, 160 μg S-100-Protein; 8 μg Poly U.

Wie Tabelle 7 zeigt, war durch Fällung mit Äthanol in der Kälte keine Steigerung der Ribosomenaktivität zu erzielen. Zu den Reaktivierungsversuchen ist anzumerken, daß sie jeweils nur einmal versucht wurden. Der Aussage-wert ist dadurch begrenzt.

OPTIMIERUNGSVERSUCHE

1. Kinetik des ^{14}C Phenylalanin-Einbaus im Poly U/Poly Phe-System

Der zeitliche Verlauf des Phenylalanineinbaus in säurefällbares Material sei an zwei Versuchen mit Extrakten verschiedener Präparationen dargestellt (Fig. 2).

Bei guter Aktivität erfolgt Einbau bis mindestens 60 Minuten. Die andere Präparation, die etwa um den Faktor 6 weniger aktiv ist, lieferte Einbau bis ca. 30 Minuten.

In den übrigen Versuchen wurde der Ansatz 40 Minuten inkubiert, und Proben bei 20 und 40 Minuten entnommen.

Figur 3 zeigt zum Vergleich die Kinetik des E. coli-Systems (MRE 600), in dem der Gesamteinbau um den Faktor 50 höher ist.

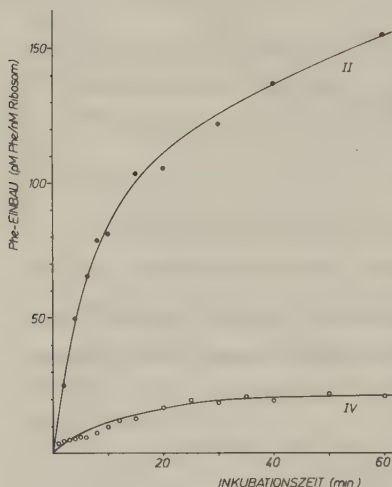


Abb. 2

Zeitlicher Verlauf des Phe-Einbaus in säurefällbares Material.

Dargestellt sind zwei Präparationen mit stark unterschiedlicher Aktivität (Einbaukinetik).

Die Keime zu beiden Präparationen stammen aus derselben Züchtung.

— ● — ● : Präp. II

— ○ — ○ : Präp. IV

Pro 100 μ l Ansatzvolumen wurden eingesetzt:

	Präp. II	Präp. IV
Ribosomen	5,4 OD ₂₆₀	10,8 OD ₂₆₀
S-100	250 μ g	640 μ g
Poly U	8 μ g	8 μ g
Phe	2 nM	2 nM

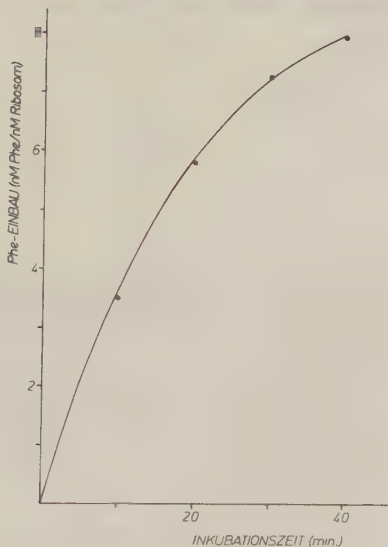


Abb. 3

Zum Vergleich:
Einbaukinetik im System mit zellfreien Extrakten aus *E. coli*.
Der Einbau ist in Nanomol aufgetragen. (nM Phe/nMRib.)
Pro 100 μ l Ansatzvolumen wurden eingesetzt:
Ribosomen: 7,4 OD₂₆₀
S-100-Protein: 450 μ g
tRNA aus *E. coli*: 200 μ g
Poly U: 8 μ g
Phe: 2 nM

2. Optimale Ribosomen-Konzentration

Die Abhängigkeit des Phe-Einbaus vom Gehalt an Ribosomen im Ansatz zeigen die beiden folgenden Diagramme (Fig. 4 und 5), wobei wiederum Material aus verschiedenen (drei) Präparationen mit unterschiedlicher Aktivität eingesetzt wurde.

Es ist zu ersehen, daß Einbau in Abhängigkeit von der Ribosomenkonzentration erfolgt. Bei der Präparation höherer Aktivität ist die optimale Ansatzkonzentration

12 - 14 OD₂₆₀, bei der anderen 5 - 7 OD₂₆₀ Ribosomen pro 100 µl Ansatz.

Solange die Präparationen in ihrer Aktivität stark differieren und damit vermutlich auch der Anteil der aktiven Ribosomen variiert, kann kein allgemein gültiges Ansatzoptimum angegeben werden, sondern dieses muß für jede Präparation neu bestimmt werden.

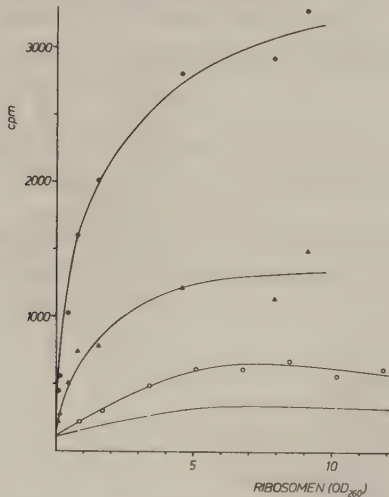


Abb. 4
Zusammenhang zwischen Phenylalanineinbau und Gehalt des Ansatzes an Ribosomen, dargestellt an zwei Präparationen.

Untersucht wurde der Bereich von 0 bis etwa 9 (bzw. 12) OD₂₆₀.

— ● — ● — : Entnahmen nach 40 Minuten Inkubation (Präp. XX)

— ○ — ○ — : Entnahmen nach 40 Minuten Inkubation (Präp. XIV)

Als Maß für den Phe-Einbau sind hier die cpm aufgetragen. Pro 100 µl Ansatz setzten wir ein:

	Präp. XX	Präp. XIV
Ribosomen variiert	etwa 0 - 9 OD ₂₆₀	0 - 12 OD ₂₆₀
S-100-Protein	222 µg	440 µg
Poly U	16 µg	8 µg
Phe	2 nM	2 nM

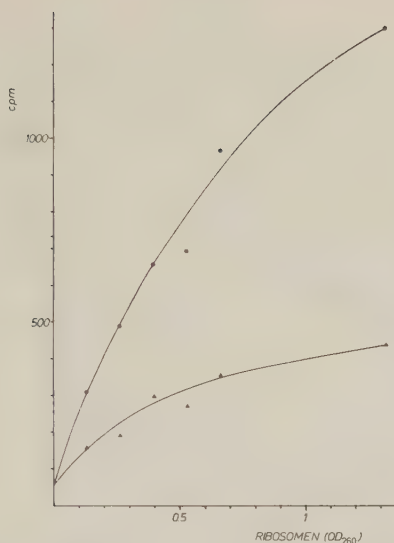


Abb. 5

Weitere Untersuchung zur Abhängigkeit zwischen Ribosomen-gehalt im Ansatz und Phenylalanineinbau.

Es wurde hier nur maximal 1/10 der Ribosomenmenge ver-glichen mit Abb. 4 eingesetzt.

Aufgetragen sind als Einbaumaß die cpm.

— ● — ● — : Einbau nach 40 Minuten Inkubation

— ▲ — ▲ — : Einbau nach 20 Minuten Inkubation

100 μ l Ansatz enthielt:

Ribosomen, variiert, aus Präp. XVIII 0 - 1,33 OD₂₆₀;
S-100-Protein, aus Präp. XVIII 322 μ g; Poly U 16 μ g;
Phe 2 nM.

3. Optimale S-100-Konzentration

Fig. 6 zeigt, daß der Einbau auch vom Gehalt an S-100-Fraktion im Ansatz abhängig ist. Mit 700 μ g/100 ml An-satz ist hier eben erst das Optimum erreicht. Da im An-satz nur ein Volumen von höchstens 70 μ l für S-100 zur Verfügung steht, muß man bei der Präparation versuchen, in möglichst wenig Aufschlußpuffer aufzunehmen, um einen möglichst konzentrierten Extrakt zu erhalten.

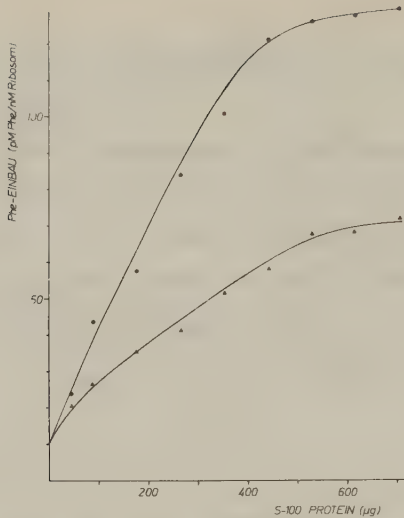


Abb. 6

Abhängigkeit des Phenylalanin-Einbaus von der Konzentration der S-100-Fraktion im Reaktionsansatz.

— ● — ● — : Einbau nach 40 Minuten Inkubation

— ▲ — ▲ — : Einbau nach 20 Minuten Inkubation

Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden eingesetzt:
Ribosomen (Präp. XIV): 3,4 OD₂₆₀; S-100-Protein (Präp. XIV), variiert: 0 - 700 µg; Poly U: 8 µg; Phe: 2 nM.

4. Optimale Poly U-Konzentration

Das Einbausystem arbeitet, wie Fig. 7 zeigt, in Abhängigkeit von Poly U und ist mit 20 µg/100 µl Ansatz gesättigt. Dies steht in Einklang mit dem anderwärts (1) gefundenen Optimum.

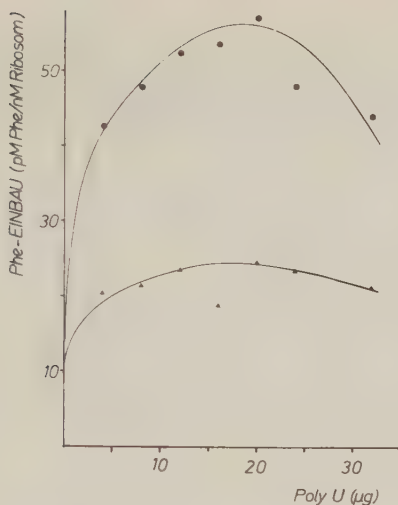


Abb. 7

Untersuchung der optimalen Konzentration an synthetischem Messenger im Ansatz.

— ● — ● — : Entnahme nach 40 Minuten Inkubation

— ▲ — ▲ — : Entnahme nach 20 Minuten Inkubation

Eingesetzt pro 100 µl Ansatz:

Ribosomen (Präp. XIV): 8,5 OD₂₆₀; S-100-Protein (Präp. XIV): 440 µg; Poly U variiert: 0 - 32 µg; Phe: 2 nM.

5. Optimale Phenylalanin-Konzentration

Variiert man das Phe-Angebot im Ansatz, indem zu ¹⁴C Phe hoher spezifischer Aktivität ¹²C Phe zugegeben wird, so verläuft der Einbau wie in Fig. 8 gezeigt. Man sieht, daß steigendes Phe-Angebot vermehrten Einbau bewirkt. Bei fast allen anderen Versuchen wurde die höchste der hier eingesetzten Phe-Konzentrationen verwendet.

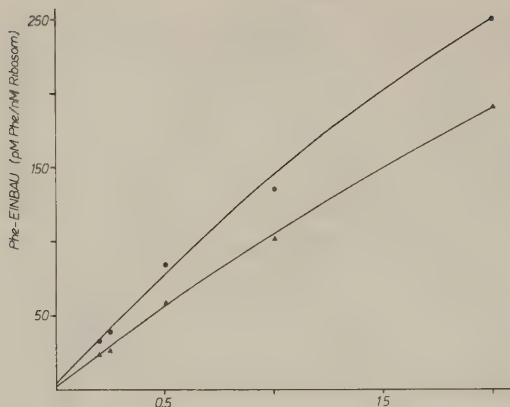


Abb. 8
Darstellung des Einbaus als Funktion des Phe-Angebots.

Das Phe-Angebot wurde variiert durch stufenweise Erniedrigung der spezifischen Aktivität durch Zugabe von ^{12}C Phe.

— ● — ● — : Entnahmen nach 40 Minuten Inkubation

— ▲ — ▲ — : Entnahmen nach 20 Minuten Inkubation

Pro 100 μl Reaktionsansatz wurden eingesetzt:
Ribosomen (Präp. II): 5,4 OD_{260} ; S-100-Protein (Präp. II): 250 μg ; Poly U: 8 μg ; Phe variiert: 0,2 - 2,0 nM.

6. Einfluß von Calcium-Ionen auf den Phe-Einbau

Die von (2) beschriebene Stimulation des Poly U/Poly Phe-Systems durch Zusatz von CaCl_2 (optimale Ansatzkonzentration 20 mMol/ltr.) ließ sich bei uns nicht nachvollziehen.

Fig. 9 zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der in-vitro Proteinsynthese durch Calcium-Ionen. Bei einigen, hier nicht dargestellten Versuchen fiel auf, daß der Einbau nach 40 Minuten niedriger war, als nach 20

Minuten, was bedeuten würde, daß Ca^{++} den Abbau der synthetisierten Polypeptide begünstigt.

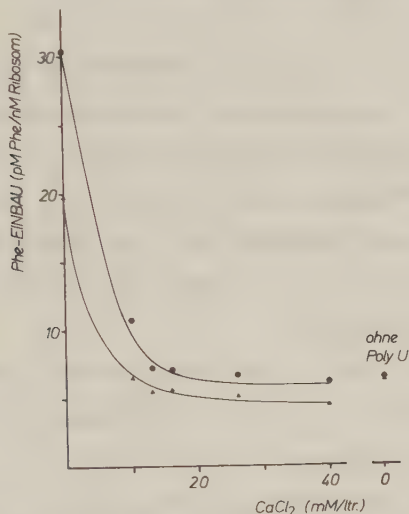


Abb. 9
Untersuchung der Wirkung von zugesetztem CaCl_2 auf das Poly U/Poly Phe-System.

— ● — ● — : Einbau der Entnahme nach 40 Min. Inkub.

— ▲ — ▲ — : Einbau der Entnahme nach 20 Min. Inkub.

Pro 100 μl Ansatzvolumen wurden eingesetzt:
Ribosomen (Präp. XIV): 10,2 OD_{260} ; S-100-Protein (Präp. XV): 400 μg ; Poly U: 16 μg ; Phe: 2 nM.

Verhalten des Poly U/Poly Phe-Systems bei Zugabe von
verschiedenen tRNA-Spezies

Die unterschiedliche Aktivität des Poly U/Poly Phe-Systems bei den unter verschiedenen Ernährungsbedingungen gezüchteten *L. viridescens*-Keimen wird nach (2) durch die Aktivität der Überstandsfaktoren bestimmt. Ziel mußte es deshalb sein, zwischen Aktivitätsunterschieden bedingt durch Änderungen an der tRNA, den Enzymen oder anderen Faktoren zu suchen.

Um den Einfluß von tRNA aus verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen, mußte ein tRNA-abhängiges System erarbeitet werden.

Um ein tRNA-abhängiges System zu erhalten muß

1. im S-100-Überstand vorhandene tRNA durch Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden, ohne daß die biologische Aktivität des Überstandes verloren geht.
2. tRNA aus *L. viridescens* präpariert werden, die sich im Akzeptoraktivitätstest als funktionstüchtig erweist.

Wie sich tRNA-Zusatz zum System auswirkt, wenn endogen vorhandene tRNA nicht entfernt wird, ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Einbau von Phe im Peptidisiersystem aus
L. viridescens in Abhängigkeit von der
tRNA. S-100-Fraktion n i c h t chro-
matographiert.

Ansatz	Einbau nach 20 und 40' (pM Phe/ nM Ribosom)	% Einbau	% Einbau ohne Messenger	% Einbau ohne Rib/S-100
<u>ohne</u> tRNA	4,01 4,64	100	--	--
mit tRNA aus				
L. viridescens	4,26 4,38	106 94	5 4	4 2
E. coli	4,87 4,97	122 107	6 4	5 2

Pro 100 μ l Ansatz wurden eingesetzt:
Ribosomen (Präp. II): 5,3 OD₂₆₀; S-100-Fraktion:(Präp. II)
nicht chromatographiert: 250 μ g; Poly U: 8 μ g; Phe: 0,2 nM;
tRNA aus E. coli (Boehringer): 50 μ g, tRNA aus L. virides-
cens (Eigenpräparation): 74 μ g. Akzeptoraktivität der
tRNA aus L. viridescens nicht geprüft.

Die Tabelle zeigt, daß hier, bei Verwendung nicht chroma-
tographierter S-100-Fraktion, also ohne Abtrennung endo-
gener tRNA, der Zusatz von tRNA zum System praktisch
keinen Einfluß hat, daß also die S-100-Fraktion aus-
reichend endogene tRNA enthält.

Um den Einfluß zugesetzter tRNA zu untersuchen, muß folg-
lich vorher durch Ionenaustauschchromatographie die en-
dogen vorhandene tRNA abgetrennt werden.

Die Untersuchung des Einflusses von tRNA ist aber nötig,

da der Überstand für die verminderte Aktivität unter Mangelbedingungen verantwortlich sein soll (2).

S-100-Chromatographien über DEAE-Zellulose wurden mehrfach durchgeführt. Das Vorgehen ist unter "Methoden" beschrieben.

Figur 10 zeigt ein Elutionsprofil der S-100-Chromatographien über DEAE-Zellulose. Mit 0,1 M Trispuffer ließ sich ein Doppelgipfel eluieren, nach Erhöhung der Ionenstärke auf 1,0 Tris folgt im Gradienten ein weiterer Gipfel und später ein dritter.

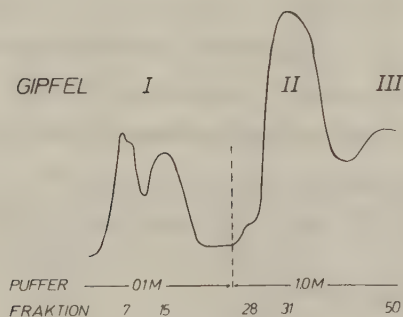


Abb. 10
Schematisches Elutionsprofil unserer S-100-Chromatographien über DEAE-Zellulose.

Angegeben sind die später verwendeten Bezeichnungen der Gipfel, der Zeitpunkt des Pufferwechsels sowie die Nummern der Fraktionen. Elutionsdaten: Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h Fraktionen zu 1,25 ml

Tabelle 9: Aktivität der chromatographierten S-100-Fraktion, Gipfel I.

Ansatz	Einbau von pM Phe/ nM Ribosom nach 20 und 40 Min.	%
ohne tRNA	2,42	100
	3,74	100
mit tRNA aus...		
L. viridescens	2,01	83
	3,33	89
E. coli	12,80	530
	16,68	450
Hefe, Phe-spezif.	4,65	192
	7,19	192

100 µl Ansatz enthalten:

10,4 OD₂₆₀ Ribosomen (Präp. VII); 22 µg S-100-Protein (Präp. VII, chromatographiert, I. Gipfel); 74 µg tRNA aus *L. viridescens*; 50 µg tRNA aus *E. coli*; 33 µg tRNA aus Hefe; 8 µg Poly U; 0,2 nM Phe.

Tabelle 9 zeigt, daß die bereits beschriebene Hemmung (2) der Inkorporation durch Zusatz von tRNA aus *L. viridescens* eintritt. Die Prüfung der hier verwendeten tRNA im Akzeptoraktivitätstest ergab, daß die tRNA nicht mit Aminosäuren beladen werden konnte. Die Befunde mit tRNA aus *E. coli* und Hefe legen den Schluß nahe, daß die Inkorporationshemmung durch tRNA aus *L. viridescens* nicht Folge des Überschusses an tRNA war, sondern dadurch bedingt war, daß die aus *L. viridescens* präparierte tRNA

biologisch nicht aktiv ist.

50 µg tRNA aus *E. coli* stimuliert um den Faktor 5, Phe-spezifische tRNA aus Hefe verdoppelt den Einbau von Phe (jeweils verglichen mit dem Ansatz ohne tRNA). Der Proteingehalt der eingesetzten Fraktion des ersten Gipfels war so gering, daß damit keine Sättigung des Systems erreicht wurde.

Tabelle 10: Aktivität des chromatographierten S-100-Überstandes, Gipfel II.

Ansatz	Einbau von pM Phe/ nM Ribosom nach 20 und 40 Min.	%
ohne tRNA	16,25	100
	18,43	100
mit tRNA aus...		
<i>L. viridescens</i>	3,63	22
	4,43	24
<i>E. coli</i>	59,51	367
	73,16	397
Hefe, Phe-spezif.	80,57	496
	107,14	581

Ansatz wie in Tabelle 9. Es wurde jedoch 180 µg/100 µl Ansatz Protein aus Gipfel II der chromatographierten S-100-Fraktion eingesetzt.

tRNA aus *L. viridescens* vermindert den Einbau, tRNA aus *E. coli* stimuliert um etwa den Faktor 4. Die Stimulation durch Phe-spezifische tRNA aus Hefe um den Faktor 5 ist besonders stark.

Qualitativ stimmen die Ergebnisse von Tabelle 9 und 10 überein.

Ob durch die zugesetzte tRNA das System bereits gesättigt ist, wurde hier nicht untersucht, ist aber unwahrscheinlich, Ebenso dürfte durch das pro Ansatz angebotene S-100-Protein keinesfalls Sättigung erreicht worden sein. Eine Einengung des Eluats zur Erhöhung des Proteingehalts ist nicht versucht worden.

Die Proteingehalte von Gipfel I und II differierten so stark, daß ein unmittelbarer Einbauvergleich erschwert ist. Unter der Annahme, daß der Proteingehalt der S-100-Fraktion für den Einbau limitierend ist, wurden die Werte aus Tabelle 9 und 10 umgerechnet auf 100 µg Protein.

Siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Vergleich von Tabelle 9 und 10 bei einheitlichem Bezug auf 100 µg S-100-Protein.

Ansatz	Einbau pro 100 µg S-100-Protein nach 20 und 40 Min. (pM Phe/nM Rib./100 µg S-100-Protein)	
	Gipfel I	Gipfel II
ohne tRNA	11,0	9,04
	17,0	10,24
mit tRNA aus...		
L. viridescens	9,14	2,02
	15,13	2,46
E. coli	58,15	33,10
	75,80	40,65
Hefe, Phe-spezif.	21,15	44,75
	32,70	59,60

Legende siehe Tabelle 9 und 10.

Aus den Experimenten mit chromatographierter S-100-Fraktion und isolierter tRNA kann bisher festgehalten werden:

1. Wird die in der S-100-Fraktion vorhandene tRNA nicht entfernt, so führte Zusatz von 74 µg tRNA aus *L. viridescens*, 50 µg tRNA aus *E. coli* oder 33 µg tRNA aus Hefe weder zu einer Inkorporationshemmung noch zu einem Anstieg des Einbaus der Aminosäuren in ein

säurefällbares Protein. Die in der S-100-Fraktion vorhandene tRNA reicht aber unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einer optimalen Proteinsynthese.

2. Gipfel I und II, gemäß Figur 10, sind durch Zusatz von tRNA aus *E. coli* und Hefe deutlich in ihrer Proteinsyntheseaktivität zu steigern. Biologisch inaktive tRNA aus *L. viridescens* führte zu einer Einbauverminderung. (Die Inaktivität ist im Akzeptoraktivitätstest gezeigt worden.)

Der Fall, daß tRNA, die Aminosäuren akzeptierte, im Proteinsynthesystem eine Hemmung bewirkte, ist bei uns nicht eingetreten, unabhängig davon, ob durch Chromatographie tRNA aus S-100 abgetrennt worden war oder nicht, D. h., daß im untersuchten Bereich auch ein tRNA-Überschuß zu keiner Inkorporationshemmung führte, solange die tRNA intakt war.

Der Versuch, f u n k t i o n s f ä h i g e tRNA aus *L. viridescens* mit i n t a k t e m tRNA-freiem Überstand ins System einzusetzen, konnte nicht durchgeführt werden, da uns niemals beide Komponenten gleichzeitig in biologisch aktiver Form zur Verfügung standen. Die in Tabelle 8 - 10 gezeigten Befunde mit tRNA aus *E. coli* und Hefe lassen aber den Schluß zu, daß tRNA-Abtrennung durch Chromatographie über DEAE-Zellulose sehr wohl stattfindet. Da durch anschließende tRNA-Zugabe deutliche Stimulation möglich ist, kann festgestellt werden, daß das System prinzipiell tRNA-abhängig zu machen ist.

Daß sich das System bei Zugabe biologisch aktiver tRNA aus *L. viridescens* anders verhalten würde, ist nicht zu erwarten.

Nach dem Ergebnis des Hauptexperiments erschien eine Suche nach unterschiedlicher Aktivität des Systems in verschiedenen Wachstumsphasen, bedingt durch die tRNA nicht mehr vordringlich. Ein anderer Befund trat in den Vordergrund:

Der Aktivitätsverlust der Ribosomen im Thiaminhunger überwog den der S-100-Fraktion um mehr als das doppelte. Deshalb erfolgte die Einordnung der Chromatographieexperimente unter den Vorversuchen.

Weiter wurde die Frage untersucht, ob mit 50 µg tRNA aus *E. coli* (wie in Tab. 9 und 10) der Sättigungsbereich bereits erreicht war. Ferner wurde die Aktivität des 3. Gipfels der chromatographierten S-100-Fraktion getestet.

Die hier verwendeten Ribosomen stammen aus der gleichen Präparation wie die für die Experimente der Tabellen 9 und 10.

Tabelle 12: Phe-Einbau im Poly U/Poly Phe-System mit chromatographierter S-100-Fraktion, bei Zugabe von verschiedenen Mengen tRNA aus E. coli.

Ansatz mit S-100 aus Gipfel:	Einbau von pM Phe/ nM Ribosom nach 20 und 40 Min.	%
I	10,84	-
	17,21	
III	85,53	-
	108,99	
II	26,33	100
	33,62	
II + 150 µg tRNA	82,43	314
	105,32	314
II + 500 µg tRNA	155,00	589
	191,10	568

100 µl Ansatz enthielten:

10,4 OD₂₆₀ Ribosomen (Präp. VII); S-100-Protein: 80 µg (1. Gipfel), 70 µg (2. Gipfel), 60 µg (3. Gipfel); 8 µg Poly U; 2 nM Phe; tRNA aus E. coli in angegebener Menge.

Tabelle 12 zeigt

1. ohne tRNA-Zusatz stimuliert der 3. Gipfel der chromatographierten S-100-Fraktion die Peptidsynthese am stärksten.

Das spricht dafür, daß im 3. Gipfel tRNA eluiert wird.

2. Zusatz von 150 µg bzw. 500 µg tRNA aus E. coli zu

Enzym aus Gipfel II steigert den Einbau beträchtlich. Ob damit bereits Sättigung erreicht ist kann nicht gesagt werden.

Untersuchungen zur Akzeptoraktivität der tRNA-Präparationen aus *L. viridescens*

tRNA wurde mehrfach, sowohl aus Keimen durch direkte Phenol-Extraktion, als auch aus S-100-Überstand, der über Wochen eingefroren war, durch Phenolextraktion präpariert. Es wurde nach der Methode von Avital-Elson (19) verfahren. Die einzige Modifikation war, daß wir die tRNA nach der LiCl-Fällung und Dialyse durch kaltes Äthanol ausfällten, nicht durch fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Behandlung. Das Testsystem ist unter "Methoden" beschrieben worden. Lediglich eine tRNA von vier Präparationen konnte mit Aminosäuren beladen werden. Diese, und nur diese Präparation erbrachte Material von gallertartiger, hochvisköser Konsistenz. Die Akzeptoraktivität war 10 % der gleich präparierten und getesteten tRNA aus *E. coli*. Die tRNA wurde auf Verunreinigungen mit RNA und DNA auf einer MAK-Säule geprüft (*L. Bohne*). Neben reiner tRNA zeigte sich eine geringe DNA-Beimengung. Elektrophoretisch wanderte die tRNA normal, 16 S und 23 S-RNA waren nicht nachweisbar. (Daten: 10 % Acrylamid/2,8 % Acrylamid-0,5 % Agarose-Gel; 3 Stunden bei 70 mA und ca. 310 V) (*S. Nees*).

Das Problem der Präparation aktiver tRNA aus *L. virides-*

cens wurde nach dem Ergebnis des Hauptexperiments nicht weiter verfolgt.

Der Aktivitätsverlust der Ribosomen im "Thiaminhunger" überwog den der S-100-Fraktion. Eine weitere Analyse der S-100-Fraktion wurde deshalb zugunsten der Ribosomen zurückgestellt.

In Tabelle 13 ist das Ergebnis zweier Akzeptoraktivitätstests mit tRNA aus *L. viridescens* dargestellt. Als Leerwerte wurden je ein Ansatz ohne tRNA und einer ohne Enzym durchgeführt.

Tabelle 13: Akzeptoraktivitätstests mit intensiverer Waschung der Filterplättchen.

	cpm Versuch 1	cpm Versuch 2
Komplettansatz mit 7 OD ₂₆₀ tRNA aus <i>L. viridescens</i>	3541	4775
Ansatz ohne tRNA	458 = 13 %	399 = 8 %
Ansatz ohne Enzym	515 = 13 %	460 = 10%

Die intensivere Waschung ist unter "Methoden" beschrieben. Versuch 1 und 2 wurden mit dem gleichen Material an verschiedenen Tagen durchgeführt. Pro 100 µl Ansatz wurden 10 µg S-100-Protein und 0,2 nM Phe eingesetzt.

Die Leerwerte, die vor der Modifizierung der Waschung 25 - 30 % vom Komplettansatz betragen haben, ließen sich (Tab. 13) auf ca. 10 % senken.

Tabelle 14: Aminoacylierung von tRNA aus *E. coli* und
L. viridescens mit Enzym aus *L. viridescens*.

	cpm nach 20 + 40 Min. Inkubation	akzeptierte pM Phe/OD ₂₆₀ tRNA
Ansatz mit 7 OD ₂₆₀	5931	0,912
tRNA aus <i>L. viridescens</i>	6459	1,001
Ansatz mit 11,4 OD ₂₆₀	3270	0,207
tRNA aus <i>E. coli</i>	4608	0,407
Ansatz <u>ohne</u> tRNA	1019 1037	---
Ansatz ohne Enzym, mit 7 OD ₂₆₀ tRNA aus ²⁶⁰ <i>L. viridesc.</i>	2422 3342	0,446 0,428

Inkubationsbedingungen siehe "Methoden"; pro 100 µl Ansatz wurden 0,2 nM Phe und 10 µl S-100-Protein eingesetzt. Die Waschung wurde wie im Peptidisiersystem durchgeführt (ohne Hydrolyse).

Tabelle 14 zeigt, daß das Enzym aus *L. viridescens* die homologe tRNA besser belädt, als tRNA aus *E. coli*.

Die Leerwerte, besonders der ohne Enzym, sind sehr hoch; offensichtlich wird markiertes Phenylalanin auch ohne Enzym unspezifisch an tRNA angelagert. Der Versuch wurde vor Einführung der intensiveren Waschung durchgeführt.

Tabelle 14: Aminoacylierung von tRNA aus *L. viridescens*
in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

	Inku- bation	S-100-Protein ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatz)						Ohne tRNA
		0	17	34	68	136	204	68
cpm nach	20'	2296	4930	4249	3307	3276	3843	946
	40'	3929	9744	7217	5304	4771	4301	866

Es wurde, wie unter "Methoden" beschrieben, vorgegangen; Waschung wie im Peptidisieransatz. Pro 100 μl Ansatz wurden eingesetzt: 0,2 nM/Phe; 2,8 OD₂₆₀ tRNA aus *L. viridescens*; S-100-Protein wie angegeben.

Tabelle 15 zeigt im Bereich von 17 - 204 μg Protein eine Abnahme der cpm. Dieser Befund ließe sich damit erklären, daß in allen Ansätzen ein Überschuß der zur Beladung nötigen Acylsynthetasen vorlag, und daß Hemmfaktoren des Überstandes, bei wachsender Konzentration, die Beladung vermindern. Der Volumenanteil der S-100-Fraktion im Ansatz mit den höchsten cpm beträgt nur 1 % des Gesamtansatzvolumens.

Haben die Vorversuche ihr Ziel, die Optimierung des Poly U/Poly Phe-Systems aus *L. viridescens* erreicht? Ist es gelungen, ein zellfreies System zur Proteinsynthese zu erhalten, das sich als Testsystem eignet, weil die Phenylalanin-Inkorporation nur noch von dem Parameter abhängt, der variiert wird?

Das System arbeitet in Abhängigkeit von der Konzentration an Ribosomen, S-100, Poly U, und benötigt Energie.

Auch wenn, um seres Wissens, optimale Bedingungen gewählt wurden, so ist es schwierig gewesen, gleich aktive Präparationen herzustellen.

Insgesamt ist der Phenylalanin-Einbau im *L. viridescens*-System nicht hoch gewesen: maximal 0,9 nM Phe/nM Ribosom bei *L. viridescens*, verglichen mit 8 nM Phe/nM Ribosom bei *E. coli*.

Die Angabe einer optimalen Ribosomenkonzentration im Ansatz ist nur für die jeweils getestete Präparation zulässig, da die Ribosomen offenbar sehr sensibel sind. Der Anteil defekter Ribosomen in verschiedenen Präparationen ist verschieden hoch.

Da der Einbau von etwas mehr als 0 bis zu maximal 0,9 nM Phe/nM Ribosom schwankte, mit Präparationen aus der gleichen Wachstumsphase, stellt sich die Frage nach der Aussagekraft unterschiedlicher Aktivitäten von Präparationen aus verschiedenen Wachstumsphasen. Anders ausgedrückt: ist es überhaupt zulässig, Ergebnisse mit Keimen aus verschiedenen Wachstumsphasen mitzuteilen, solange innerhalb einer Phase keine konstante Proteinsyntheseaktivität sicher erreichbar ist?

Wir glauben, Artefakte dadurch weitgehend ausgeschlossen zu haben, daß

1. Züchtung und Aufschluß der Keime, Behandlung der Extrakte und Durchführung von Ansätzen, so weit als möglich, in gleicher Weise durchgeführt wurden.
2. Ansätze nach Möglichkeit in einem Arbeitsgang doppelt, sowie mit anderem Material an einem anderen Tag durchgeführt wurden.

3. Immer Leerwerte mitbearbeitet wurden, aus deren Radioaktivität Aussagen über die Effektivität der Waschung gewonnen werden konnten.

Die Tatsache, daß in den folgenden Hauptexperimenten die Phase mit der geringsten Aktivität weitaus höheren Einbau zeigte, als eine der schlecht aktiven Präparationen aus der Log-Phase in den Vorversuchen (Tabelle 2), und sich eine eindeutige Abhängigkeit der Ribosomenaktivität von der Wachstumsphase ergibt, spricht dafür, daß die beobachteten Aktivitätsunterschiede keine Artefakte sind. Bei dem Hauptexperiment sind weitere Sicherungen gegen Zufallsbefunde eingeschaltet worden, indem die miteinander verglichenen Ansätze am selben Tag in einem Arbeitsgang durchgeführt wurden und die benötigten Extrakte am selben Tag nebeneinander präpariert wurden.

Im Hauptteil sollen Aktivitätsuntersuchungen an Extrakten aus Keimen verschiedener Wachstumsphasen durchgeführt werden. Sie knüpfen an bereits anderwärts (2) angestellte Untersuchungen an, und ergänzen diese zu einer Gesamtaussage über das Aktivitätsverhalten des proteinsynthetisierenden Systems im Thiaminmangel.

Es war bereits bekannt, daß die Aktivität des Überstandes im Thiaminmangel abnimmt. Nicht bekannt war, ob dafür die tRNA, die Enzyme oder andere Faktoren verantwortlich waren. Ein Aktivitätsverlust der Ribosomen im Thiaminhunger war festgestellt worden, sowie eine rasche Neusynthese aktiver Ribosomen nach Thiaminzugabe. Ob Ribosomen oder S-100-Überstand stärker an Aktivität verlieren, sollte hier untersucht werden.

Es wurden drei Wachstumsphasen an jeweils einem Zeitpunkt untersucht:

1. "Log-Phase": Keime, die in APT bis ca. $0,75 \text{ OD}_{578}$ gewachsen waren.
2. "Hunger-Phase": Keime, die, wie unter "Methoden" beschrieben, unter reduziertem Thiamingehalt im Medium bis ca. $0,9 \text{ OD}_{578}$ gewachsen waren und anschließend 12 Stunden in thiaminfreiem Medium verblieben.
3. "Restaurations-Phase": Keime, die nach Behandlung wie bei 2. 40 Minuten mit $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Thiamin versetzt worden waren.

Figur 11 gibt eine schematische Wachstumskurve des Keims wieder, mit den Zeitpunkten von Bakterienernten und Thiaminzugabe.

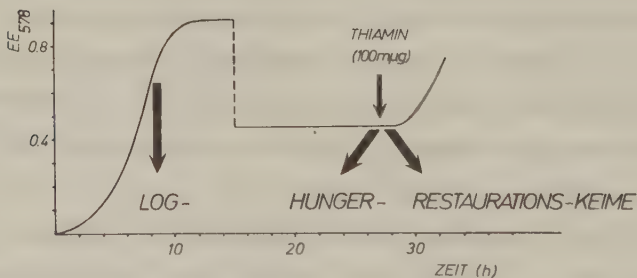


Abb. 11
Schematische Darstellung des Wachstums von *L. viridescens*.
Eingezeichnet sind die Zeitpunkte der Bakterienernten, sowie der Thiaminzugabe.
(Die Log-Phase-Keime wurden allerdings in APT-Vollmedium gezüchtet).

Es wurden Ribosomen und S-100-Fraktion aller drei Phasen präpariert und die Ribosomen aus den drei Phasen mit den Überständen aus den drei Phasen kreuzweise ins Poly U/Poly Phe-System eingesetzt.

Wir erhielten a) die Aktivität von Ribosomen verschiedener Phasen mit Überstand der Log-Phase.

b) die Aktivität von Ribosomen der Restaurations- und der Hunger-Phase mit den verschiedenen Überständen.

Dies erlaubt die Aussage, wie Ribosomen aus Mangelkeimen die Aktivität des Poly U/Poly Phe-Systems beeinflussen.

Aufgeführt sind vier Versuche: IA, I B, II A, II A.

Die Versuche I A und B bzw. II A und B sind jeweils mit Material d e r s e l b e n Präparation (Ribosomen und S-100) an verschiedenen Tagen durchgeführt worden und stellen ihrerseits Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Alle Ansätze enthalten die gleiche Menge Ribosomen (etwa 11 OD_{260}), und gleiche V o l u m i n a an S-100-Fraktion. Sämtliche hier verwendeten Keime der Log-Phase stammen aus einer Züchtung. Die Keime aus der Restaurationsphase für Versuch I und II sind in voneinander unabhängigen Züchtungen gewonnen worden.

Vergleiche der Aktivität des Poly U/Poly Phe-Systems mit Ribosomen und S-100-Fraktion verschiedener Wachstumsphasen

1. Aktivität im homologen System aus Keimen verschiedener Wachstumsphasen (Tabelle 16)

Der Vergleich der homologen Systeme, (d. h. Ribosomen und S-100-Fraktion aus d e r s e l b e n Wachstumsphase) zeigt, daß die Aktivität in der Log-Phase am größten ist. Sie wurde 100 % gesetzt. Nach 12stündigem "Thiamin-Hunger" sinkt sie auf ca. 7 %. 40 Minuten nach Thiaminzugabe erreicht sie bereits wieder 15 - 25 %. Diese Befunde stimmen in etwa mit den Ergebnissen von Julien (2) überein, wie die letzte Spalte von Tabelle 16 zeigt.

Legende zu Tabelle 16:

Pro 100 µl Ansatz wurden eingesetzt:

<u>Ribosomen:</u> (OD ₂₆₀)	Versuche	
	I	II
Log-Phase (Präp. XVIII):	4,0	{Präp. XX): 4,6
Hunger-Phase (Präp. --):	---	{Präp. XXIa): 4,4
Restaurations-Phase (Pr. XIX):	4,3	{Präp. XXI): 4,8

S-100-Fraktion: (µg)

Log-Phase (Präp. XVIII):	451	{Präp. XX): 408
Hunger-Phase (Präp. --):	---	{Präp. XXIa): 381
Restaurations-Phase (Pr. XIX):	310	{Präp. XXI): 183

Ferner: 16 µg Poly U; 2 nM Phenylalanin

Die Versuche I bzw. II sind mit Material derselben Präparation an verschiedenen Tagen durchgeführt worden. Die Keime der Restaurations-Phase für Versuch I und II stammen aus verschiedenen Züchtungen. Präparation der Extrakte und Durchführung der Ansätze erfolgten wie unter Methoden beschrieben.

Tabelle 16: Untersuchung der Aktivität des homologen Systems in Keimen verschiedener Wachstumsphasen

Versuch	Wachstumsphase der Ribosomen		Einbau nach 20 und 40 Min. (pM Phe/nM Rib)	% bzgl. Log/Log	% bei (2)
I A	Log	Log	152 357	100	100
I B	Log	Log	198 482	100	100
II A	Log	Log	375 762	100	100
II B	Log	Log	403 811	100	100
II A	Hunger	Hunger	24 62	6 8	4
II B	Hunger	Hunger	27 60	6 7	
I A	Restau.	Restau.	45 91	30 25	14
I B	Restau.	Restau.	38 94	20 22	
II A	Restau.	Restau.	46 99	14 14	
II B	Restau.	Restau.	50 108	13 14	

2. Aktivität von Ribosomen verschiedener Wachstumsphasen,
getestet mit S-100 aus der Log-Phase (Tabelle 17).

Die von uns bestimmte Aktivität der Ribosomen bei einheitlicher Verwendung von Überstand der Log-Phase ist den Ergebnissen von Julien gegenübergestellt, siehe Tabelle 17. Die im Thiaminmangel verbliebene Aktivität der Ribosomen betrug bei uns ca. 15 %, bei Julien 8 %.

Die Stimulation der Hunger-Ribosomen durch den Log-Überstand (statt des homologen aus der Hunger-Phase) war bei Julien und uns ca. 2,3fach; siehe Tabelle 17.

In der Restaurationsphase stieg die Aktivität der Ribosomen im System mit Log-S-100 von 15 % auf ca. 25 % der der Log-Phase-Aktivität. Da das homologe System der Restaurations-Phase 15 - 25 % an Aktivität besessen hatte, entspricht das einer Stimulation durch Log-Überstand um maximal den Faktor 1,6.

Bei (2) waren 30 Minuten nach Thiamin-Zugabe bereits 50 % der Ribosomenaktivität zurückgewonnen, und das, nachdem sie um Thiamin-Hunger etwas weiter abgesunken war als bei uns. Die Aktivität des homologen Systems der Restaurations-Phase betrug dort 14 % des Maximums; durch Verwendung von Log-Überstand wurden wieder 50 % der Maximalaktivität erreicht, d. h. es wurde hierdurch um den Faktor 3,6 stimuliert.

Tabelle 17: Untersuchung der Ribosomenaktivität in verschiedenen Wachstumsphasen
(als S-100-Fraktion wurde ausschließlich die der Log-Phase verwendet)

Ver- such	Wachstumsphase der Ribosomen		Einbau nach 20 + 40 Min. (pMPhe/nMRib)	% bzgl. Log/Log	*) S _Ü	%bzgl Log/L (2)	*) S (2)
I A	Log	Log	152 357	100	1	100	1
I B	Log	Log	198 482	100	1		
II A	Log	Log	375 762	100	1		
II B	Log	Log	403 811	100	1		
II A	Hunger	Log	59 111	15 14	2,4 1,8	8	2,1
II B	Hunger	Log	71 126	17 15	2,7 2,1		
I A	Restau.	Log	42 101	27 28	0,9 1,1	50	3,6
I B	Restau.	Log	49 99	27 23	1,3 1,0		
II A	Restau.	Log	74 142	21 20	1,6 1,4		
II B	Restau.	Log	80 171	21 22	1,6 1,6		

*) S_Ü = Stimulation des Einbaus durch Verwendung von Überstand der Log-Phase, gegenüber dem aus der Phase der Ribosomen.
*) S (2) = entsprechender Wert bei (2).

3. Aktivität der S-100-Fraktion verschiedener Wachstumsphasen,
getestet mit Ribosomen der Log-Phase (Tab. 18).

Tabelle 18 zeigt das Aktivitätsverhalten des S-100-Überstandes in den untersuchten Phasen, wenn er mit Ribosomen der Log-Phase ins Poly U/Poly Phe-System eingesetzt wird. Die Aktivität nimmt im 12stündigen Thiamin-Hunger auf 60 - 70 % der der Log-Phase ab. (Vergleichswerte von (2) liegen nicht vor.)

Das homologe System der Hunger-Phase (Tabelle 16) besaß nurmehr 7 %, so daß die Log-Ribosomen eine Stimulation des Hunger-Überstandes um etwa den Faktor 9 bewirkten. Der Vergleich von Tabelle 17 und 18 läßt den quantitativen Unterschied im Aktivitätsverhalten von Ribosomen und S-100 deutlich werden:

Dort wurden Ribosomen mit Log-Überstand getestet, hier (Tabelle 18) die Aktivität des Überstandes mit Log-Ribosomen.

In beiden Fällen nimmt die Aktivität im Poly U/Poly Phe-System gegenüber dem Maximum ab, wenn eine der beiden Komponenten aus der Hunger-Phase eingesetzt wird und steigt wieder an, oder bleibt gleich, nachdem Thiamin zugegeben wurde. Das Ausmaß der Aktivitätsänderungen ist jedoch ganz unterschiedlich.

Vergleich man mit dem homologen System der Hunger- bzw. der Restaurationsphase, so ließ sich in beiden Fällen durch eine Komponente aus der Log-Phase der Einbau steigern, d. h., daß beide Komponenten im Mangelzustand eine Aktivitätseinbuße erleiden.

Die Ribosomenaktivität (Tabelle 17) fiel im Hunger auf

etwa 15 % ab, während der Einbau im homologen System der Hunger-Phase auf 7 % zurückging. Der Überstand der Log-Phase konnte also nur eine Steigerung um etwa den Faktor 2,3 bewirken.

Die Aktivität des S-100-Überstandes, mit Log-Ribosomen getestet, fiel aber im Hunger auf 65 - 70 % zurück, während das homologe System der Hunger-Phase nur 7 % Aktivität besaß.

Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes der S-100-Fraktion ist also geringer als bei den Ribosomen. D. h. aber, daß die Stimulation des homologen Systems der Hunger-Phase durch optimal aktive Log-Ribosomen entsprechend größer ausfällt, nämlich um den Faktor 9. Allge mein ist die Stimulierbarkeit des homologen Systems der Hunger-Phase durch eine Komponente der Log-Phase umso größer, je mehr Aktivität diese Komponente unter Mangelbedingungen einbüßt.

Tabelle 18: Aktivität der S - 100 - F r a k t i o n
in verschiedenen Wachstumsphasen
(getestet ausschließlich mit Ribosomen der
Log-Phase)

Versuch	Wachstumsphase der		Einbau nach 20 + 40 Min. (GMPhe/nMRib.)	% bzgl. Log/Log	*) S _R
	Ribosomen	S-100-Fr.			
I A	Log	Log	152 357	100	1
I B	Log	Log	198 482	100	1
II A	Log	Log	375 762	100	1
II B	Log	Log	403 811	100	1
II A	Log	Hunger	242 539	65 71	9,9 8,8
II B	Log	Hunger	242 542	60 67	9,1 9,0
I A	Log	Restau.	140 347	92 97	3,1 3,8
I B	Log	Restau.	171 446	86 97	4,6 4,7
II A	Log	Restau.	212 485	57 64	4,6 4,9
II B	Log	Restau.	240 535	60 66	4,8 4,9

Legende: Siehe Tabelle 16

*) S_R = Stimulation des Einbaus durch Verwendung von Log-Ribosomen, anstatt der aus der Phase des Überstands.

Zusammenfassend kann deshalb gesagt werden, daß im Hunger S-100 und Ribosomen an Aktivität verlieren, der Verlust der Ribosomen aber mehr als doppelt so hoch ist als der der S-100-Fraktion.

Ob 40 Minuten nach Thiamin-Zugabe im Überstand bereits einbausteigernde Restaurationsvorgänge stattgefunden haben, ist nach den vorliegenden Werten (Tabelle 18) nicht sicher zu entscheiden. Hier differieren die Ergebnisse der Versuche I und II. Nach den Versuchen I wäre mit 86 - 97 % die Maximalaktivität fast erreicht, zumindest ein Aktivitätsanstieg des Überstandes gegenüber der Hunger-Phase sicher, während aus den Versuchen II nicht einmal letzteres hervorgeht.

Die Stimulation des homologen Systems der Restaurations-Phase durch die Ribosomen der Log-Phase ist hier geringer als in der Hunger-Phase. Der Grund hierfür ist die aus Tabelle 17 ersichtliche geringfügige Aktivitätszunahme der Ribosomen bereits 40 Minuten nach Thiamin-Zugabe. Damit ist der Aktivitätsunterschied zwischen Log- und Restaurations-Phase-Ribosomen kleiner geworden; ebenso die Stimulierbarkeit des homologen Systems der Restaurations-Phase durch Log-Ribosomen.

Außerdem ist eine zusätzliche Aktivitätszunahme der S-100-Fraktion der Restaurations-Phase, wie oben gesagt, nicht auszuschließen.

Tabelle 19: Untersuchung der Proteinsynthese-Aktivität
mit Ribosomen und S-100 aus Restaurations-
und Hunger-Phase

Versuch	Wachstumsphase von		Einbau nach 20 + 40 Min. (pMPhe/nMRib.)	% Einbau bzgl. Log/Log
	Ribosomen	S-100		
II A	Restaur.	Hunger	38 89	10,1 11,7
II B	Restaur.	Hunger	41 95	10,2 11,7
II A	Hunger	Restaur.	25 60	6,7 7,9
II B	Hunger	Restaur.	28 69	7,0 8,5

Legende: siehe Tabelle 17

Tabelle 19 zeigt die noch fehlenden "Kombinationen" die aus den drei Überständen und den dreierlei Ribosomen, die präpariert wurden, möglich sind.

Ferner bietet sich nochmals Gelegenheit, die Frage zu untersuchen, ob der Überstand 40 Minuten nach Thiamin-Zugabe in der Proteinsynthese aktiver geworden ist als der der Hunger-Phase.

Vergleiche mit den Tabellen 16, 17 und 18 zeigen, daß sich die hier gezeigten Ergebnisse lückenlos einpassen:

Der Einbau im Log/Log-System wurde gleich 100 % gesetzt.

Ersatz der Log-Ribosomen durch die der Restaurationsphase (Tabelle 17), ließ die Aktivität auf ca. 25 % absinken.

Wird nun, wie hier, zusätzlich der Log-Überstand durch den der Hunger-Phase ersetzt, so sinkt die Aktivität nochmals ab, auf ca. 10 %. Die Aktivität des homologen Systems der Restaurations-Phase (Tabelle 16), hatte nach 15 - 25 % betragen. Hieraus folgt, daß die für die Ribosomen in Tabelle 17 gefundene Aktivitätsrangfolge auch für die Überstände gilt. Die Aktivität des Überstandes der Restaurations-Phase ist höher als die des Überstandes aus der Hunger-Phase (vergleiche Tabelle 18 und 19).

Mit Ribosomen der Hunger-Phase sinkt die Aktivität des Systems auf 15 % (Tabelle 17). Zusätzlicher Austausch des Log-Überstandes gegen den der Restaurations-Phase (Tabelle 19) führt zum Aktivitätsabfall auf 8 %. Das heißt, daß der Überstand der Restaurations-Phase weniger aktiv war als der der Log-Phase (Tabelle 19). Das homologe System der Hunger-Phase (Tabelle 16) besaß noch etwa 7 % Aktivität. Der Überstand der Restaurations-Phase ist kaum aktiver als der der Hunger-Phase. Das gilt mit Ribosomen aus der Log-Phase (Tabelle 18) und Ribosomen aus der Hunger-Phase (Vergleich Tabellen 16 und 19). Ribosomen aus der Restaurations-Phase sind etwas aktiver mit S-100 aus der Restaurations-Phase (Tabelle 16) als mit dem der Hunger-Phase (Tabelle 19).

Tabelle 20: Übersicht über die wichtigsten Daten der
in den Tabellen 16 - 19 dargestellten Versuche

Versuch	Wachstumsphase der Ribosomen		Einbau nach 40' (pMPhe/nM Rib.)	% bzgl. Log/Log
I A	Log	Log	357	100
I B			482	
II A			762	
II B			811	
II A	Log	Hunger	539	71
II B			542	67
I A	Log	Restau.	347	97
I B			446	97
II A			485	64
II B			535	66
I A	Hunger	Hunger	62	8
I B			60	7
II A	Hunger	Log	111	14
II B			126	15
II A	Hunger	Restau.	60	8
II B			69	9
I A	Restau.	Restau.	91	25
I B			94	22
II A			99	14
II B			108	14
I A	Restau.	Log	101	28
I B			99	23
II A			142	20
II B			171	22
II A	Restau.	Hunger	89	12
II B			95	12

Legende siehe Tabelle 16. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Daten für 40 Min. Inkubation berücksichtigt.

Die Ergebnisse des Hauptexperiments kann man wie folgt kurz zusammenfassen:

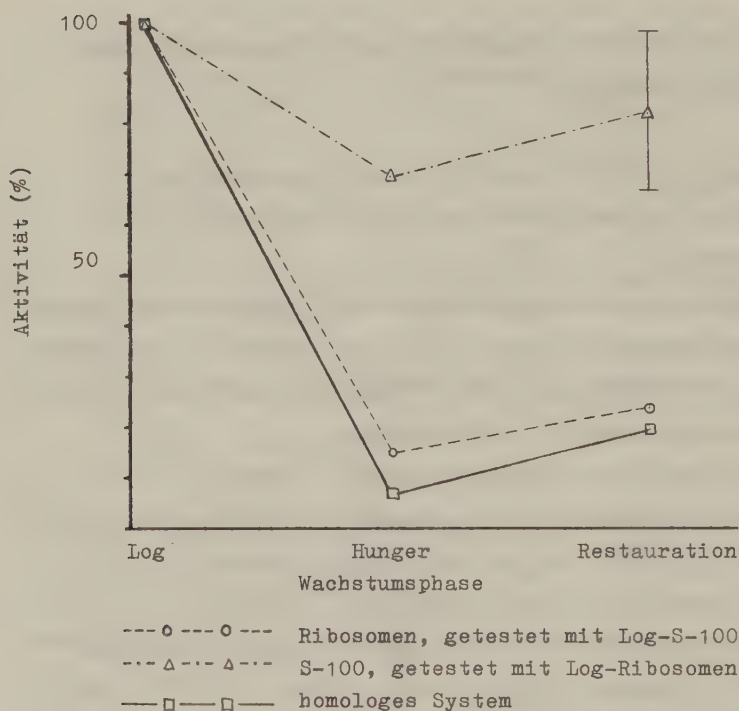
Maximale Aktivität im Poly U/Poly Phe-System hat das homologe System mit Ribosomen und Überstand aus der Log-Phase.

Ersatz einer der beiden Komponenten durch die entsprechende der Hunger-Phase führt zu einer Abnahme des Phe-Einbaus. Der Aktivitätsverlust der Ribosomen ist mehr als doppelt so hoch wie der der S-100-Fraktion.

40 Minuten nach Thiaminzugabe hat die Aktivität der Ribosomen bereits wieder zugenommen; ob gleiches für den Überstand gilt, ist aus den vorliegenden Werten nicht zu entscheiden; aus einem Teil der Experimente ist ein Anstieg abzulesen, nach den anderen wäre die Aktivität des Überstandes in Hunger- und Restaurations-Phase etwa gleich.

Die folgende Skizze (Fig. 11) soll das Ergebnis graphisch zusammenfassen.

Fig. 11: Schematische Darstellung der Aktivitäten von Ribosomen, S-100, und homologem System in den verschiedenen Wachstumsphasen



Nachdem gezeigt ist, daß Ribosomen unter Thiamin-Mangelbedingungen an Aktivität verlieren, stellt sich die Frage nach dem morphologischen Substrat dieses Befundes.

Es könnte sein, daß der Aktivitätsverlust ausschließlich oder partiell dadurch bedingt ist, daß im Thiamin-Mangel ribosomale Proteine von der betreffenden Untereinheit abgehen.

Bei der Auftrennung ribosomalen Proteins aus Keimen verschiedener Wachstumsphasen durch 2-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese müssten sich dann unterschiedliche Protein-Muster ergeben. Es könnten in den

unter Thiaminmangel gewachsenen Keimen Proteine fehlen und / oder neue "Flecken" auftreten.

Für die Auftrennung ist es wichtig, die Proteine biologisch aktiver Ribosomen mit der für die betreffenden Wachstumsphase charakteristischen biologischen Aktivität verwenden zu können, da Proteilmuster defekter Ribosomen keine sinnvolle Interpretation erlauben.

W. Loh trennte uns ribosomale Proteine durch 2-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese auf. Es wurden unsere Ribosomen der Log- und Restaurations-Phase der Präparationen verwendet, die in den Versuchen I eingesetzt worden waren, also solche von bekannter biologischer Aktivität.

Auf eine Identifizierung der einzelnen Flecken und einen detaillierten Vergleich der Einzelproteine in den verschiedenen Phasen kann hier nicht eingegangen werden (siehe dazu Diss. W. Loh).

Den Platten war zweifelsfrei zu entnehmen, daß die Ribosomen der beiden Wachstumsphasen unterschiedliche Proteilmuster haben. Damit ist sicher, daß eine Veränderung der Proteinzusammensetzung der Ribosomen zumindest eine der Auswirkungen des Thiaminmangels auf die Ribosomen ist.

Diskussion:

Ziel der Arbeit war es, die Proteinsyntheseaktivität des thiaminauxotrophen Mikroorganismus *Lactobacillus viridescens* unter normalen Ernährungsbedingungen, bei Thiaminmangel und nach Beseitigung des Mangelzustands zu untersuchen. Entsprechend dem Vorgehen bei der Präparation liegen Ribosomen und S-100-Überstand getrennt vor. Durch Kreuzexperimente mit Extrakten aus Keimen der drei Wachstumsphasen kann die Aktivität von Ribosomen und S-100-Überstand in den drei Phasen bestimmt werden. Daran wird sich der Versuch anschließen müssen, die veränderte Aktivität mit morphologischen Befunden in Einklang zu bringen, und endlich die Ursache für alles Folgende in der Rolle des Thiamins für eine fundamentale Stoffwechselreaktion zu finden. Vor dieser Arbeit war die Aktivität des homologen Systems und die der Ribosomen bereits untersucht worden. Die Kenntnis der Aktivitäten des S-100-Überstandes fehlte noch zu einer Gesamtaussage über den Aktivitätsverlauf unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen. Um zu prüfen ob das verwendete zellfreie Poly U/Poly Phe-System sich als Testsystem eignete, mußten eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt werden, um die Abhängigkeit des Einbaus von einer Anzahl von Parametern kennen zu lernen und um später möglichst günstige Bedingungen wählen zu können. Die Vorversuche dienten ferner dazu, die Reproduzierbarkeit von Befunden zu überprüfen, um den

späteren Ergebnissen mit der nötigen Kritik begegnen zu können.

Das zellfreie System aus *L. viridescens* hat, bei Vorgehen nach den dargestellten Methoden, insgesamt wesentlich geringere Aktivität als ein vergleichbares System aus *E. coli*.

Möglicherweise ist ein Unterschied wesentlich: Bei allen Versuchen mit *L. viridescens*, soweit sie nicht speziell den Einfluß von tRNA zum Gegenstand hatten, wurde keine tRNA zugegeben, sondern nur die in S-100 enthaltene ausgenutzt. Der Grund hierfür war, daß durch die bisher präparierte tRNA aus *L. viridescens* nie eine Einbausteigerung zu erzielen war. Dies wäre damit zu erklären, daß die S-100-Fraktion bereits einen Überschuß an endogener tRNA enthält oder die zugesetzte tRNA nicht funktionsfähig ist, aber keine Inkorporationshemmung zur Folge hat. Einige Präparationen bewirkten jedoch Hemmung der Proteinsynthese. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von (2).

Ein gleich präpariertes System aus *E. coli*, ohne Zusatz von tRNA bringt nur ca. 10 % der Maximalaktivität.

Es wäre möglich, daß auch ein System aus *L. viridescens* um ein vielfaches aktiver wäre, wenn optimale homologe tRNA zur Verfügung stünde. Abtrennung endogener tRNA durch Ionenaustauschchromatographie bringt, wie gezeigt wurde, ein System, das durch heterologe tRNA erheblich

aktiviert werden kann.

Wie in Tabelle 2 gezeigt wurde, war eine routinemäßige Präparation aktiver Zellextrakte lange Zeit nicht möglich (Präp. I - XVII); es kamen immer wieder Präparationen vor, deren Aktivität äußerst gering war.

Mit den Präparationen XVIII - XXI erhielten wir dagegen durchweg hohe Einbauraten. In den Präparationen aus Log-Phase-Keimen (XVIII, XX) wurden die höchsten Phe-Einbauten, die uns jemals ohne tRNA-Zugabe möglich waren, erreicht.

Nur Gipfel II und III der S-100-Chromatographie (Gipfel II mit Zusatz von tRNA aus *E. coli*) lieferten noch höheren Einbau. Maximaler Einbau dürfte durch bestimmte Fraktionen des chromatographierten S-100-Überstandes mit Zugabe voll aktiver tRNA aus *L. viridescens* zu erzielen sein.

Die homologe tRNA wird, wie die Tests zur Akzeptoraktivität gezeigt haben, besser beladen als die tRNA aus *E. coli*. In der "Roh-S-100-Fraktion" könnten, im Gegensatz zu bestimmten Fraktionen der S-100 nach Chromatographie, neben den zur Proteinsynthese notwendigen Faktoren solche sein, die den Einbau hemmen.

Die Züchtung von *L. viridescens* muß in komplexen Nährmedien erfolgen. Es wäre denkbar, daß das Wachstum bei verschiedenen Züchtungen nicht exakt reproduzierbar ist, und daß die Zusammensetzungen verschiedener Chargen des Mediums nicht vollständig übereinstimmen. Damit würden aber nur unterschiedliche Aktivitäten in Präparationen aus Keimen verschiedener Züchtungen erklärt; bei solchen derselben Züchtung können die Ursachen nur im Aufschluß

und der Behandlung der Extrakte liegen. Mit dem Hinweis auf "besonders hohe Labilität" der Extrakte aus *L. viridescens* im Gegensatz zu solchen aus *E. coli* ist das Phänomen jedoch nicht erklärt.

Für die Beobachtung, daß aktive Ribosomen innerhalb von Wochen, in flüssiger Luft gelagert, nicht nur, wie günstigstenfalls angenommen werden könnte, die Aktivität behalten, sondern scheinbar "ausreifen", können wir keine Erklärung geben. Ein Wiedereinfrieren in flüssiger Luft und Auftauen angebrauchter Ribosomen-Chargen führte bei zwei Versuchen zu keinerlei Aktivitätseinbuße aktiver Ribosomen.

Der rasche Aktivitätsverlust, der bei weniger aktiven Ribosomen bei bloßer Lagerung in flüssiger Luft auftritt, könnte erklärt werden als Folge einer partiellen Schädigung mit erhöhter Labilität.

Wie Takanami (20) berichtet, haben mit NH_4Cl gewaschene Ribosomen aus *E. coli* die gleiche Aktivität wie "crude ribosoms", was auch für *L. viridescens* bestätigt wird (2). Gewaschene Ribosomen sind aber wegen der dadurch verminderten RNase-Aktivität über ein Jahr ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Der berichtete rasche Aktivitätsabfall der Ribosomen aus *L. viridescens* (20 % in 8 Tagen), könnte Folge der Tatsache sein, daß die NH_4Cl -Waschung unterblieben ist (2).

Die Versuche zur Reaktivierung wurden nur einmal durchgeführt; eine Differenzierung zwischen möglichen Gründen für das Mißlingen kann deshalb nicht gegeben werden. Die Tests zur Bestimmung der Akzeptoraktivität der tRNA aus *L. viridescens* hatten bei uns weniger den Sinn, Bedingungen für eine optimale Beladung zu erhalten, als vielmehr das System so weit zu entwickeln, daß entschieden werden konnte, ob eine präparierte tRNA Aminosäuren akzeptierte oder unbeladbar war.

Hierzu war die Erniedrigung der Radioaktivität der Leerwerte deutlich unter die der Kontrollwerte und eine günstige Proteinkonzentration im Ansatz nötig. Die parallel durchgeführte Testung der Beladbarkeit von tRNA aus *E. coli* mit bekannter biologischer Aktivität sollte ausschließen, daß durch defektes Enzym falsch negative Aussagen über die Beladbarkeit gemacht wurden.

Die Befunde der Chromatographie-Versuche haben durch das Ergebnis des Hauptexperiments etwas an Bedeutung verloren. Es ist gelungen, ein tRNA-abhängiges System aus *L. viridescens* zu erhalten, indem durch Ionenaustauschchromatographie im Überstand vorhandene tRNA abgetrennt werden konnte. Damit ist eine getrennte Suche nach unterschiedlicher Aktivität des Systems in verschiedenen Wachstumsphasen, bedingt durch Änderung an den Enzymen und/oder der tRNA möglich geworden. D. h., es könnten chromatographierte S-100-Überstände verschiedener Wachstumsphasen

mit, tRNAs verschiedener Phasen "kreuzweise" getestet werden; alle Ansätze müßten mit Ribosomen der gleichen Phase durchgeführt werden, um nicht zwei Parameter gleichzeitig zu variieren.

Analog dem 2-Komponentensystem "Ribosomen-S-100" würde dann eines mit "tRNA - chromatographierte S-100" durchgetestet werden müssen.

Das Hauptexperiment hat jedoch gezeigt, daß die Aktivität der S-100-Fraktion im Hunger nur auf ca. 65 % zurückfällt, die der Ribosomen dagegen auf 15 % der Maximalaktivität. Eine Untersuchung des starken Aktivitätsverlustes der Ribosomen liegt deshalb näher als die des erheblich geringeren Verlustes der S-100-Fraktion. Zu einer Lokalisierung des Aktivitätsverlustes des Überstandes an den Enzymen oder der tRNA oder anderen Faktoren, wäre die Präparation von tRNAs aller zu untersuchenden Wachstumsphasen nötig, was auf die genannten Schwierigkeiten stößt.

Für ein Hämoglobin-synthetisierendes System aus Kaninchen-Reticulozyten ist eine Methode beschrieben worden (18), um das System tRNA-abhängig zu machen; hierbei werden die Polysomen mit 4 M KCl behandelt. Wir versuchten dieses Verfahren auf Ribosomen aus *L. viridescens* anzuwenden, erhielten jedoch Ribosomen, die nicht aktiv waren.

Die Hauptversuche haben ergeben, daß Ribosomen und die S-100-Fraktion im Thiaminmangel an Aktivität verlieren, und die Ribosomen nach Thiaminzugabe wieder aktiver in der Proteinsynthese werden.

Es wurden eine Reihe von morphologisch faßbaren Veränderungen an den Ribosomen im Thiaminmangel gefunden, deren Folge die verminderte Proteinsyntheseaktivität sein könnte: Auftreten von 60 S- statt der 70 S-Ribosomen, verursacht durch einen Verlust an 23 S und 16 S rRNA; Abnahme der Zahl der Ribosomen auf $1/3$ bis $1/2$ der der Log-Phase; Verlust der Dimerisierungsfähigkeit (1). Nach Loh et al. (21) zeigen ribosomale Proteine der Hunger-Phase gegenüber denen der Log-Phase eine verändertes Muster in der 2-dimensonalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Außerdem ist der Prozentanteil der Aminosäuren Threonin, Arginin und Lysin erniedrigt. Bei der Vielzahl der Veränderungen bereits morphologisch faßbarer Befunde, die die Struktur des Ribosomes betreffen, ist ein ungestörter Ablauf der Proteinsynthese nicht zu erwarten.

Als mögliche Ursache des - verglichen mit den Ribosomen - geringen Aktivitätsverlust der S-100-Fraktion, ist nach den bisherigen Untersuchungen die partielle Degradation der tRNA, die neben der der hochmolekularen RNA auftritt, denkbar.

Schwieriger ist es, die beschriebenen Veränderungen direkt auf das Fehlen des Thiamins zurückzuführen, d. h.

den "Stoffwechselblock" zu finden, als dessen Folge alle beschriebenen Veränderungen im Thiaminmangel und nach seiner Aufhebung anzusprechen sind. Es muß sich hierbei um eine Reaktion handeln, die Thiaminpyrophosphat als Coenzym benötigt.

Die Synthese von Makromolekülen und die Aufrechterhaltung von Gradienten erfordern Energie. Die beschriebene Abnahme der Aktivität des Proteinsyntheseapparats im Thiaminmangel (Degradation der Ribosomen) sowie die Aktivitätszunahme nach Thiaminzugabe (Neusynthese von rRNA und r-Proteinen) lassen die Vermutung zu, daß der wechselnde Energievorrat der Zelle eine Rolle spielt.

L. viridescens gehört zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien und ist als Anaerobier nicht in der Lage, Reduktionsäquivalente, die bei der Glucoseoxidation anfallen, über die Atmungskette zu reoxidieren. Die heterofermentativen Milchsäurebakterien haben keine Aldolase und Triosephosphat-Isomerase; der Glucoseabbau erfolgt deshalb durch Oxidation an C_1 und Umwandlung in Xylulose-5-Phosphat (22). Hierbei wird noch keine Energie gewonnen.

Der nächste Schritt, die Spaltung des Xylulose-5-Phosphat durch die Phosphoketolase erfordert Thiaminpyrophosphat, Mg^{++} und anorganisches Phosphat (23).

Fehlt das Coenzym, so wird die Bildung der Stoffwechselprodukte Laktat und Äthanol verhindert. Diese Reaktionen verlaufen unter Energiegewinn und ermöglichen die Reoxidation von $NADPH + H^+$ und $NADH + H^+$.

Zusammenfassung:

Bei Mangel an Vitamin B₁, Aneurin, Thiamin, tritt Beri-Beri auf. Es ist bisher nicht gelungen, die bei der Krankheit beobachteten Ausfallerscheinungen mit der bekannten Funktion des Thiamins direkt zu erklären. Thiamin ist in der Form des Thiaminpyrophosphates das Coenzym der Transketolase-Reaktionen. Welche Folgen im einzelnen die verminderte Aktivität oder der Ausfall dieser Enzyme für den Zellstoffwechsel hat, ist bisher weitgehend unbekannt. Es war daher die Frage gestellt, welche molekularen Reaktionen bei Mangel an Vitamin B₁ betroffen sind. Als Untersuchungsobjekt wurde der Thiamin abhängige Mikroorganismus *Lactobacillus viridescens* gewählt. Das Wachstum dieses Keimes ist proportional der Konzentration an Thiamin im Nährmedium im Bereich von 2,5 - 100 µg/ml. Wird das Thiamin aus dem Nährmedium entfernt, so hören alle Wachstumsprozesse und die Zellteilung auf.

Der Entzug des essentiellen Nährstoffes hat Auswirkungen auf die Integrität der Zellen und ihres Stoffwechsels. So auch auf die Aktivität des Protein synthetisierenden Systems. Gibt man zu Keimen, die 12 Stunden beim Thiaminmangel gehalten wurden, erneut Thiamin hinzu, so beginnt nach ca. 1 - 2 Stunden das Wachstum und die Zellteilung erneut.

Hier sollte untersucht werden, welche der verschiedenen Komponenten des Protein synthetisierenden Systems für die Reduzierung der Aktivität vorwiegend verantwortlich sind. Aus Keimen der normalen Wachstumsphase, der Hungerphase und der Restaurationsphase nach Wiedergabe von Thiamin, wurde das Protein synthetisierende System extrahiert, in seine Komponenten aufgeteilt und in Kreuzexperimenten getestet.

In sehr ausführlichen Vorversuchen mußten die optimalen Bedingungen für die Präparation und Analyse des Systems gesucht werden, da für *L. viridescens* nicht die gleichen Bedingungen gelten wie für *E. coli*.

In den Hauptversuchen wurde jeweils aus den Keimen der drei Wachstumsphasen Ribosomen und Überstand isoliert und kreuzweise miteinander inkubiert. Die Aktivität des Protein synthetisierenden Systems ist in logarithmisch wachsenden Keimen optimal und wurde 100 % gesetzt. Nach 12 Stunden Thiaminmangel fällt die Aktivität auf 7 % ab. 40 Minuten nach Zugabe von Thiamin zu Mangelkeimen steigt die Proteinsyntheseaktivität auf 25 % an. Durch die Kreuzexperimente konnte belegt werden, daß im wesentlichen Ribosomen für diesen Aktivitätsabfall verantwortlich sind. Die Aktivität dieser Ribosomen aus Hungerkeimen beträgt auch mit Überstand aus Log-Phase-Keimen nur 15 %. - Es konnte gezeigt werden, daß diese verminderte Aktivität darauf zurückzuführen ist, daß im Hunger die Ribosomen bestimmte Proteine verlieren (Loh).

Der S-100-Überstand ist im "Thiamin-Hunger" ebenfalls in der Proteinsynthese weniger aktiv (ca. 70 % der des Log-Überstandes).

Der Wiederanstieg der Aktivität des Protein synthetisierenden Systems nach Zugabe von Thiamin zu Mangelkeimen ist darauf zurückzuführen, daß die Ribosomen ihre Aktivität sehr bald zurückgewinnen. Die während des Hungers verlorengegangenen Proteine werden sehr schnell nachsynthetisiert.

Literatur:

- (1) Kersten H., K.H. Averkamp, W Braatz, P. Greif, W. Kersten und
B. Hess H.-S. Z. Physiol. Chem. 349, 1619, 1969
- (2) Julien J., H. Kersten und B. Hess
H.-S. Z. Physiol. Chem. 350, 1635, 1969
- (3) Greif P.
Diss. Münster, 1968
- (4) Deibel, Evans und Niven
Bacteriol. Proc. 1957
- (5) Evans und Niven
J. Bacteriol. 62, 599, 1951
- (6) Media for the Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids
Difco Laboratories, Detroit, p. 52
- (7) Matthaei H. und M. Nirenberg
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1580, 1961
- (8) Nirenberg M.
Methods in Enzymology VI, 20, 1963
- (9) Lowry G., N. Rosebrough, A. Farr, und R. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951
- (10) Mejbaum W.
H.-S. Z. Physiol. Chem. 258, 117, 1939
- (11) Voigt H.P., und H. Matthaei
H.-S. Z. Physiol. Chem. 349, 54, 1968
- (12) Sander G.
Diss. Göttingen 1969
- (13) Ehrenstein G.von und D. Dais
Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 81, 1962
- (14) Boyer P.D.
The Enzymes p.99, 1962
- (15) Mans R.J. und G.D. Novelli
Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 540, 1960
- (16) Yang W.K. und G.D. Novelli
Methods in Enzymology XXc, 44, 1971
- (17) Miskin R., A. Zamir und D. Elson
J. Molec. Biol. 54, 355, 1970

- (18) Gilbert J.M. und W.F. Anderson
Methods in Enzymology XXc, 542, 1971
- (19) Avital S. und D. Elson
BBA 179, 297, 1969
- (20) Takanami M.
Methods in Enzymology XII, 492, 1967
- (21) Loh W., M. Farnbacher, L. Gürtler und H. Kersten
H.-S. Z. Physiol. Chem. 353, 1545, 1972
- (22) Schlegel H.G.
Allgemeine Mikrobiologie 2.Auflage, 1972
- (23) Krampitz L.O.
Ann. Rev. Biochem. 38, 213, 1969

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der
Materialien danke ich Prof. Dr. W. Kersten.

Besonderen Dank schulde ich Dr. S. Emmerich und Dr. B. Goertz,
die mich in die Methode eingeführt und die Durchführung der
Versuche vorzüglich betreut haben.

Lebenslauf:

23.4.1947 Geboren in Nürnberg
Vater: Emanuel Farnbacher, städt. Verw.-Beamter
Mutter: Martha Farnbacher, geb. Niedenfür, Hausfrau

1954 - 1958 Besuch der Volksschule in Nürnberg

1958 - 1967 Besuch der Hans-Sachs-Oberrealschule in Nürnberg

21.7.1967 Abitur

1967 - 1973 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg

1968 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1970 Ärztliche Vorprüfung

Oktober 1970 bis September 1971
Durchführung der Experimente zur Doktorarbeit am
Physiologisch-chemischen Institut der Universität

Oktober 1971 bis Dezember 1972
Studentische Hilfskraft am Physiologisch-chem. Institut

1973 Medizinisches Staatsexamen

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990